

# **Über die Regulation endothelialer Funktionen durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate und ihre Bedeutung für die Sepsis**

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

Anästhesiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Thomas Volk

geboren am 24. Oktober 1964 in Koblenz

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Eingereicht am: 6.10.2000

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. M. Wendt

2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Knöchel

## Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	5
I.1.	Sepsis	5
I.2.	Endothelzellen	9
I.3.	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate	14
II.	Zielsetzung	17
III.	Material und Methoden	20
IV.	Ergebnisse	23
IV.1.	Onkose durch exogene reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies in Endothelzellen	23
IV.1.1.	Reaktive Sauerstoffderivate	23
IV.1.2.	Reaktive Stickstoffderivate und Kombinationen	28
IV.1.3.	Endotheliale Onkose in der Sepsis ?	34
IV.2.	Apoptose durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies in Endothelzellen	35
IV.2.1.	Endotheliale Apoptose durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate	35
IV.2.2.	Endotheliale Apoptose durch proinflammatorische Mediatoren	38
IV.2.3.	Endotheliale Apoptose in der Sepsis ?	42
IV.3.	Signaleigenschaften reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies in Endothelzellen	43
IV.3.1.	Extrazelluläre Stimulation mit reaktiven Sauerstoffderivaten	43
IV.3.2.	Extrazelluläre Stimulation mit reaktiven Stickstoffderivaten	50
IV.3.3.	Reaktive Sauerstoffderivate als second messenger	56
IV.3.4.	Endotheliale Signale reaktiver Sauerstoffderivate durch proinflammatorische Mediatoren	58
IV.3.5.	Reaktive Stickstoffderivate als second messenger	62
IV.3.6.	Endotheliale Signale reaktiver Stickstoffderivate durch proinflammatorische Mediatoren	64

---

IV.4.	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate regeln endotheliale Funktionen im Rahmen einer Sepsis	66
IV.4.1.	Endotheliale Infektion und Produktion reaktiver Sauerstoff und Stickstoffderivate	67
IV.4.2.	Interaktionen zirkulierender Zellen mit Endothelzellen in der Sepsis	70
IV.4.3.	Endotheliale Permeabilität in der Sepsis	72
IV.4.4.	Endotheliale Kontrolle der plasmatischen Gerinnung bei Sepsis	73
IV.4.5.	Endothelabhängige Vasoregulation in der Sepsis	77
IV.4.6.	Endothelabhängiger Sauerstoffverbrauch in der Sepsis	81
IV.4.7.	Endotheliale Toleranz in der Sepsis	83
V.	Zusammenfassung und Ausblick	85
VI.	Dank	89
VII.	Literatur	90

## Abkürzungsverzeichnis:

AP-1	Transkriptionsfaktor: Aktivator Protein-1
BAEC	Bovine aortale Endothelzellen
BAVEC	Bovine adrenovaskuläre Endothelzellen
BCAEC	Bovine koronararterielle Endothelzellen
BcoEC	Bovine corneale Endothelzellen
BGEC	Bovine glomeruläre Endothelzellen
CLP	Caecum Ligation und Punktion
Ea.hy926	Hybridzelllinie aus HUVEC und A549, einer epithelialen Linie
ECV 306	spontan mutierte HUVEC-Zelllinie
GCMEC	Koronare Mikrovaskuläre Meerschweinchenendothelien
G/GO	Glukose/Glukseoxidas
HCAEC	Humane koronararterielle Endothelzellen
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie
HMLEC	Humane mikrovaskuläre Lungenendothelzellen
HOEC	Humane Omentale Endothelzellen
HSMEC	Humane Mikrovaskuläre Endothelzellen der Haut
HUVEC	Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen
HX/XO	Hypoxanthin/Xanthinoxidas
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
KAT	Katalase
LEC	Mikrovaskuläre Endothelzelllinie der Rattenleber
L-NMMA	L-N-Monomethyl-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MAEC	Mäuseaortenendothelzelllinie
MAPT-AM	1,2-bis(o-Amino-5'-Methylphenoxy)ethane-N,N,N',N',tetraacetsäure - Tetraacetoymethylester
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MLEC	Mausendothelzellen der Lunge
MBMEC	Mikrovaskuläre Mausendothelzellen des Hirns
NF $\kappa$ B	Transkriptionsfaktor: Nukleärer Faktor $\kappa$ Beta
NOS	NO-Synthase
NP	Nitroprussid-Na
PARS	Poly(ADP-Ribose)-Synthetase
PPAEC	Pulmonalarterielle Endothelzellen vom Schwein
PAEC	Aortale Endothelzellen vom Schwein
RAEC	Aortale Endothelzellen der Ratte
RBEC	Endothelzellen des Rattengehirns
RCMEC	Koronare Mikrovaskuläre Rattenendothelien
RDMEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen aus Rattenhaut
RLMEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen aus Rattenlungen
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Syndrom
SOD	Superoxiddismutase
SPAEC	Pulmonalarterielle Endothelzellen von Schaf
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin
SIN-1	3-morpholinocydonimine-N-ethylcarbamid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

## I. Einleitung

### I.1. Sepsis

Schon Hippokrates beschrieb etwa 400 v.Chr. eine Erkrankung, die nach einer Verwundung entsteht und mit Giften der Fäulnis seinen Ursprung nimmt. Erst nachdem Bakterien als Krankheitsursache durch *Robert Koch* erkannt wurde postulierten *Ziegler*, daß bakterielle Produkte den Körper vergiften und später *Schottmüller*, daß Bakterien aus einem Herd in den Blutkreislauf entweichen und die Krankheitserscheinungen einer Sepsis auslösen. Noch immer ist von elementarer Bedeutung, daß bei Patienten mit einer Sepsis ein vorhandener Herd saniert werden muss (*ubi pus, ibi evacua*). Mit dem Beginn der Antibiotikatherapie konnte zwar eine zweite wesentliche Stütze in der Behandlung septischer Patienten erfolgen, dennoch reichen diese Prinzipien nicht aus, die Sterblichkeit genügend zu senken [514]. Vor allem *Bone* erkannte, daß die Interaktion mit dem Wirt die komplexe Situation einer Sepsis besser erklären kann. Daher wurde zunächst auf einer Konsensuskonferenz erst 1991 die Sepsis definiert als die systemische Reaktion auf eine Infektion [50] und nicht das Vorhandensein einer Infektion per se. Eine Bakteriämie belegt zweifelsfrei eine Infektion, geht jedoch nicht notwendigerweise mit einer systemischen Reaktion einher, die als eine Inflamationsreaktion mit dem Begriff des SIRS (systemic inflammatory response syndrome) belegt wurde. Die Sepsisdefinition weicht damit deutlich von den CDC Kriterien ab und ist so auch nicht in der ICD 10 Klassifikation vorgegeben. Die einfach zu erhebenden Kriterien (Tabelle 1) sollten helfen zu einer standardisierten Terminologie und damit zu einer homogenen Beschreibung schwerst kranker Patienten beizutragen.

Tabelle 1: Definition der Sepsis / Schwere Sepsis / Septischer Schock

---

Sepsis ist die *systemische Antwort* auf eine *Infektion*. Sie manifestiert sich anhand mindestens zwei der nachfolgenden Kriterien, die *aufgrund der Infektion* vorhanden sind.

Körpertemperatur	> 38°C, oder < 36 °C
Herzfrequenz	> 90 Schläge/min.
Atemfrequenz	> 20 Züge/min., oder $\text{paO}_2 < 32$ Torr
Leukozytenzahl	> 12.000/ $\mu\text{l}$ , oder < 4.000/ $\mu\text{l}$ , oder >10% unreife Formen

Schwere Sepsis ist eine Sepsis mit Organdysfunktionen. Diese Dysfunktionen gehen einher mit *Perfusionsabnormalitäten*, die über eine Laktatazidose, eine Oligurie, oder eine Alteration des mentalen Status erkennbar sein können.

Septischer Schock ist die sepsis-induzierte Hypotension, oder die Notwendigkeit, Vasopressoren/inotrope Substanzen zu geben, um den Blutdruck zu halten, trotz *adäquater Volumensubstitution*.

---

Nachdem diese Definition der Sepsis international anerkannt wurde, konnten Prävalenzstudien den Anteil septischer Patienten auf Intensivstationen mit nahezu 25% belegen [58]. Bei den nachgewiesenen Keimen bei Patienten mit Sepsis sind gram-positive und gram-negative Bakterien in etwa gleich verteilt [490, 59]. Eine beachtliche Anzahl von Pilzen (17 %) und zu einem sehr geringen Anteil können auch virale Erreger für eine Sepsis verantwortlich sein [490, 59].

Die Definitionen führten zu epidemiologischen Verbesserungen, trugen aber nicht zu einer Homogenisierung der Patienten bei. Zu unterschiedlich scheinen noch immer die zugrundeliegenden Mechanismen zu sein, die letztlich das klinisch einheitlichere Bild einer Sepsis hervorrufen [356]. Das Konzept der Entstehung einer

Sepsis über die Exazerbation einer Inflamationsreaktion des Patienten führte in den vergangenen zehn Jahren zu einer grossen Anzahl von therapeutischen Versuchen eine Inflamationsreaktion zu unterdrücken. Leider schlugen all diese Studien fehl [264].

Parallele vorwiegend experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, daß eine Inflamationsreaktion prinzipiell nicht ohne eine antiinflammatorische Reaktion abläuft. Eine gleichfalls komplexe antiinflammatorische Reaktion muss also in die pathogenetischen Vorstellungen einer Sepsis integriert sein [51]. Daher wurden erneut Bemühungen gefordert, die dem Syndrom einer Sepsis über spezifischere Entitäten in Form von immunologischen oder biochemischen Charakterisierungen zu mehr Homogenität verhelfen, sodaß ergänzende mechanistische Definitionen notwendig werden [2].

Zu den klinisch auffälligsten Eigenschaften septischer Patienten zählen der Verlust des peripheren Gefäßwiderstandes mit Distributionsstörungen, das Auftreten von generalisierten Ödemen und eine Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems. Diese Veränderungen kulminieren letztlich in mehreren Organdysfunktionen bis hin zum Multiorganversagen. Das sepsisbedingte Organversagen ist die häufigste Todesursache auf Intensivstationen und ist weltweit wahrscheinlich mit einer Mortalität von 30-60% [390] behaftet. Die Behandlung septischer Patienten ist daher mit einem enormen Maß an Kosten verbunden. Vasoregulatorische Störungen sind geradezu pathognomonisch bei Patienten, die eine Sepsis entwickeln und neben der Bekämpfung der zugrunde liegenden Infektion fußen die therapeutischen Bemühungen zu weiten Teilen auf der Beeinflussung einer Mikrozirkulationsstörung und der Vasoplegie. Da Endothelien alle Gefäße auskleiden und Gefäßfunktionen regulieren, liegt es nahe, gerade diesen Zelltyp für Untersuchungen heranzuziehen, bei denen eine Vaskulopathie relevant ist [84]. Zumindest theoretisch könnten alle klinisch auffälligen Veränderungen über eine endotheliale Schädigung oder Dysfunktion erklärbar sein. Endotheliale Schäden können irreversibel als Zelltod entweder *onkotisch* (Kapitel III) oder *apoptotisch* (Kapitel IV) auftreten. Endotheliale Dysfunktionen können als Änderung ihrer *Permeabilitätseigenschaften* (VI.3.), ihrer *antikoagulatorischen Funktion* (VI.4.), ihrer *Gefäßtonusregulation* (VI.5.) bis hin zu Änderungen ihrer Regulation des

*Gewebesauerstoffverbrauchs* (VI.6.) auftreten. All diese Änderungen sind eng mit der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate verbunden. Diese Verbindung soll in systematischer Weise dargestellt werden.



## I.2. Endothelzellen

Endothelzellen sind vor allem in vitro untersucht worden. Die ersten erfolgreichen Kulturen gehen auf die frühen Siebziger Jahre zurück [234, 287]. Für gewöhnlich werden Endothelzellen aus Gewebeproben oder aus Gefäßen über unspezifische Proteasenzusätze isoliert und auf beschichteten Oberflächen kultiviert. Primäre Endothelzellen in Kultur können einige ihrer Charakteristika (pflastersteinartiges Aussehen, Expression von von Willebrandt Faktor (vWF) und flk-1, der Rezeptor für den vascular endothelial growth factor VEGF) für eine begrenzte Passagezahl behalten. Ein ganzes Arsenal anderer spezifischer Antigene kann auf Endothelzellen nachgewiesen werden. Hierzu zählen beispielsweise Lu-ECAM-1, CD31, CD34, 1F10 und MS-1 [21]. Endothelzellen können acetylierte Low-Density-Lipoproteine (ac-LDL) aufnehmen und sind zur Phagozytose fähig. Keiner dieser Marker ist für sich allein genommen ausreichend sensitiv. Deshalb benutzen die meisten Untersucher gleichzeitig mehrere Kriterien zur Identitätssicherung. Der konstitutive endotheliale Phänotyp unterliegt bereits physiologischerweise einer enormen Heterogenität. In Organen, in denen Barrierefunktionen wahrgenommen werden (Lunge, Gehirn) bilden sie dichte Verbände, wohingegen andere Organe durch endotheliale Lücken oder Fenestrierungen gekennzeichnet sind [399]. Die Oberflächen von Endothelzellen zeigen organ-, alters-, spezie- und kaliberspezifische Glykokonjugat- und Adhäsionsmolekülmuster [393]. Endothelzellen unterschiedlicher Organe und auch Isolate aus dem gleichen Organ oder gar unterschiedlicher Spezies verhalten sich unterschiedlich [542, 35, 162]. Auch in ganzen Gefäßen zeigen Endothelzellen heterogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale [219].

Im Gegensatz zu hämatopoetischen Zellen zeigen Endothelzellen die Fähigkeit zur Transdifferenzierung, das heißt, daß sie ihren Phänotyp in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen ändern können. So können beispielsweise Aortenendothelzellen die antigenen Charakteristika von Lungenendothelien annehmen, wenn sie auf einer Lungenextraktmatrix kultiviert werden und Hepatozyten können die Differenzierung zu sinusoidalen Endothelzellen oder Kardiomyozyten die Expression des von Willebrandt Faktors in mikrovaskulären Herzendothelien fördern [5]. Umgekehrt verlieren Endothelzellen

in Kultur zahlreiche Eigenschaften nach wenigen Passagen. So kann in RCMEC und GCMEC bereits nach 14 Tagen in Kultur eNOS [278] oder alkalische Phosphatase [293] herunterreguliert werden, oder die Phosphodiesteraseaktivität in BAEC abnehmen [17]. Um eine Isolations- und Kulturheterogenität zu vermeiden sind in der Vergangenheit einige Endothelzelllinien bekannt geworden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Eine Auswahl charakterisierter Endothelzelllinien

Herkunft	Bezeichnung	Immortalisierung	Referenz
Mensch, Nabelvene	SVHUEVC	SV40	[321]
	Ea.hy 926	Hybrid	[123]
	ECV 304	spontan	[464]
	ECRF 24	Papillomvirus	[146]
	HUV-EC-C	spontan	[208]
	TKM-33	spontan	[311]
Mensch, andere	HMEC-1	SV 40	[4]
	Cl.#5-1	SV 40	[249]
	SK HEP-1	?	[197]
Ratte, Leber	LEC	spontan	[395]
Ratte, Gehirn	RBE4	E1A	[406]
	GP8.3	SV40	[181]
Ratte, Herz	RHEC	spontan	[105]
Rind, Nebenniere	EJG	?	[379]
Rind, Pulmonalarterie	CPAE	?	[103]
	CPA 47	spontan	[413]
Rind, Herz	FBHE	?	[176]
Maus	SVEC4-10	SV 40	[1]
	SV-BEC	SV 40	[121]
	MAEC	spontan	[36]

Natürlich gilt für alle Endothelzelllinien ebenfalls, daß sie nur eine beschränkte Anzahl endothelialer Charakteristika stabil behalten. Untersuchungen an Einzelzellen, oder Monolayern sind daher nur bedingt und für grundsätzliche Fragestellungen interpretierbar und viele Ergebnisse sind möglicherweise niemals relevant für die medizinische Praxis. Es gehört zu den Grundproblemen der Zellkultur, daß die gewonnenen Daten oftmals nur in bestimmten Zelltypen und bei bestimmten Kulturbedingungen vorhanden sind.

Endothelzellen werden in aller Regel in Ruhebedingungen kultiviert. Dazu zählt in vielen Fällen auch die Abwesenheit von mechanischen Wirkungen des normalerweise fließenden Blutes (Schubspannung, zyklische Dehnungen und Druck). Endothelzellen reagieren sofort auf eine Schubspannungsänderung mit intrazellulären Signalkaskaden, die über Änderungen von  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  und pH beschrieben sind [353, 382, 213, 546]. Innerhalb von Minuten können Proteinkinaseaktivitäten ansteigen [79] und zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF $\kappa$ B oder AP-1 führen [336]. Spezifische schubspannungsabhängige Gene wurden dabei identifiziert [397, 471, 113]. Ganze Gefäße sind offensichtlich in der Lage, ihre Wanddicke in Abhängigkeit von der Schubspannung zu regeln und dieser Prozess ist endothelabhängig [279]. Endothelzellen zahlreicher Gefäße unterliegen physiologischerweise einer zyklischen Dehnung, die ebenfalls mit der Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden einhergeht. Typische Dehnungen in Kultur werden um 10-20 % der Zelldurchmesser mit einem der Herzfrequenz angeglichenen Zyklusintervall durchgeführt. Dagegen sind Untersuchungen zu druckabhängigen Änderungen in Endothelzellen nur spärlich vorhanden.

Aus definierten Ruhebedingungen können Endothelzellen dann nach unterschiedlichsten Behandlungen in einen aktivierten Zustand überführt werden. Phänomenologisch kann eine Aktivierung über die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen oder Stressgenen, der Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren, oder eine prokoagulatorische Oberfläche charakterisiert werden.

Zu den am besten untersuchten Adhäsionsmolekülen zählen P- und E-Selektin, die vor allem für das Rollen neutrophiler Granulozyten verantwortlich sind.

Zumindest in der Maus scheint eine basale Expression von P-Selektin in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt vorzuliegen, wohingegen E-Selektin nur nach einer Aktivierung nachweisbar ist [130]. Auch das intercellular-adhesion-molecule-1 (ICAM-1), das für eine feste Haftung von Leukozyten an Endothelien beteiligt ist, scheint unter Ruhebedingungen in zahlreichen Isolaten bereits vorhanden zu sein. Als Aktivierungsmerkmal kann eine Erhöhung der Expression von ICAM-1 fast regelhaft genutzt werden. Die Expression von vascular-cell-adhesion-molecule-1 (VCAM-1) scheint vor allem für die feste Interaktion mit mononukleären Zellen entscheidend zu sein und dient ebenfalls als Kennzeichen einer Aktivierung.

Wie auch andere Zelltypen können Endothelzellen nach Exposition mit unterschiedlichen Stressoren auch Stressgene, oder sogenannte “early-response-genes” aktivieren. Die mittlerweile gut charakterisierten Genprodukte, die für endotheliale Funktionen wichtige Regulatoren darstellen sind beispielsweise das early-growth-response-gene 1 (egr-1), die zur Familie der Hitzeschockproteine gehörende Hämoxygenase 1 (HO-1, hsp32) oder auch Cyclooxygenase-2 (COX-2).

Aktivierte Endothelzellen sind potente Produzenten von Zytokinen wie beispielsweise Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) oder einer Reihe von Chemokinen mit überlappenden Funktionen. Die hier am besten untersuchten Chemokine sind Interleukin 8 (IL-8), das neutrophile Granulozyten aktivieren kann, oder monocyte-chemoattractant-protein 1 (MCP-1), das vor allem auf Monozyten wirkt. Interessanterweise unterstützen beide Chemokine den Übergang rollender Monozyten hin zu einer festen Bindung an E-Selektin exprimierende Endothelien [163].

Näher an einer in vivo Situation können endothelabhängige Funktionen in Gefäßpräparaten untersucht werden, bei denen vergleichend das Endothel mechanisch oder enzymatisch entfernt wird [535]. Gerade solche Manipulationen führten zur Entdeckung des endothelialen Relaxationsfaktors EDRF [152], der sich später als Stickstoffmonoxid herausstellte. In den letzten Jahren konnten über intravitale Messungen vorwiegend zur Interaktion von zirkulierenden Zellen mit Endothelien enorme Fortschritte erzielt werden. Eine direkte Interaktion mit

Granulozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten ist einerseits notwendig, um unterschiedlichste Reparatur- und Abwehrprozesse ausserhalb von Gefäßen zu ermöglichen, andererseits kann zumindest tierexperimentell gezeigt werden, daß unter bestimmten Bedingungen eine generalisierte, oder pathologische Interaktion zu einer Erhöhung eines Organschadens führen kann. Die direkte Beobachtung der Interaktion unter pathologischen Zuständen kann mittlerweile auch bei Menschen nichtinvasiv beispielsweise an der Zunge eingesetzt werden [185]. Funktionelle Endotheluntersuchungen an Menschen beruhen allerdings vor allem auf Messungen von pharmakologischen Effekten endothelabhängiger Vasodilatation oder auf Versuchen der Quantifizierung von endothelabhängiger Permeabilität. In letzter Konsequenz werden auch Messungen zirkulierender Marker, die wahrscheinlich endothelialen Ursprungs sind, zur Beschreibung einer Endothelfunktion von zahlreichen Autoren herangezogen.

### I.3.      Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate

Reaktive Sauerstoffderivate sind Moleküle, die bei schrittweiser Reduktion von molekularem Sauerstoff entstehen. Zu den biologisch wichtigsten Molekülen zählen das Superoxidradikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxylradikal ( $HO^{\cdot}$ ). 1969 entdeckten McCord und Fridovich ein Enzym (Superoxiddismutase = SOD) [313], das in der Lage war,  $O_2^{\cdot-}$  zu  $H_2O_2$  zu dismutieren und damit den spontanen Zerfall zu  $H_2O_2$  enorm zu verstärken. Die Reaktion von SOD mit  $O_2^{\cdot-}$  gehört damit zu den schnellsten bekannten Katalysesystemen. Sie implizierten damit, daß reaktive Sauerstoffderivate überhaupt in biologischen Systemen vorkommen und mittlerweile sind drei unterschiedliche humane SOD bekannt [315]. Unter definierbaren Ruhebedingungen werden etwa 1-5 % des molekularen  $O_2$  zu  $O_2^{\cdot-}$  metabolisiert [40]. Neben der mitochondrialen Atmungskette scheinen vor allem Cytochrom  $P_{450}$  abhängige Reaktionen, NADH/NADPH Oxidasen [182, 37] oder auch NO-Synthasen [526, 527] als potente Quellen für Superoxid infrage zu kommen. Fehlt dieses Enzym beispielsweise aufgrund eines genetischen Defekts, so treten vermehrt toxische Wirkungen auf [402]. Auch lange schon ist bekannt, daß in Menschen eine potente enzymatische Quelle vor allem in neutrophilen Granulozyten vorliegt, die eine Superoxidproduktion nutzt, um pathogene Erreger abzutöten. Das Fehlen dieser Superoxidproduktion bei der chronischen Granulomatose ist mit einer erhöhten Infektanfälligkeit verbunden [436]. Eine Überproduktion reaktiver Sauerstoffderivate aus diesen Zellen kann aber auch mit Gewebeschäden in Verbindung gebracht werden [512]. Vor diesem Hintergrund werden die Wirkungen von reaktiven Sauerstoffderivaten noch immer als im wesentlichen schädigend betrachtet. Dagegen scheinen die nicht toxischen Mediatorfunktionen reaktiver Sauerstoffderivate erst in aktuelleren Untersuchungen an Bedeutung zu gewinnen [520].

$H_2O_2$  kann direkt in einigen enzymatischen Reaktionen (z.B. Glycollatoxidase, Uratoxidase, Glukoseoxidase) entstehen. Schon 1890 beschrieb Fenton, daß Eisen II mit  $H_2O_2$  reagiert und das Hydroxylradikal entsteht. Dieses Molekül reagiert nahezu diffusionslimitiert mit anderen Molekülen und wird als ein möglicher entscheidender Mediator für toxische Wirkungen gesehen. Alternativ zu

$\text{OH}^\cdot$  initiierten Reaktionen kann molekularer Sauerstoff ebenfalls mit  $\text{Fe}^{2+}$ , oder  $\text{O}_2^\cdot$  mit  $\text{Fe}^{3+}$  als z.B. Perferrylkomplex ( $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ ) zu Lipidperoxidationsreaktionen führen [389]. Von Singulett-Sauerstoff ( $\text{O}_1$ ) sind vergleichsweise wenig biologische Wirkungen bekannt.

Unterschiedliche Peroxidasen, einschließlich der Katalasen gelten als die wichtigsten antioxidativen enzymatischen Schutzsysteme um schädigende Wirkungen von Peroxiden zu begrenzen [13]. Zu den wichtigsten nichtenzymatischen antioxidativen Substanzen zählt das Glutathion, das in millimolarer Konzentration in allen humanen Zellen vorhanden ist, und auch Tocopherol, das das Tocopheryl-Radikal auf Vitamin C überträgt [72]. Extrazelluläre Proteine, wie Albumin, Transferrin, Coeruloplasmin, Lactoferrin, Haemopexin und Haptoglobin haben eine antioxidative Wirkung aufgrund ihrer metallbindenden Eigenschaften und wahrscheinlich, weil sie freie SH-Gruppen tragen.

Seit der Entdeckung, daß Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\cdot$ ) von Säugerzellen produziert wird, liegt eine enorme Datenmenge vor, die weit reichende biologische Funktionen dieses Radikals belegt. Eine ausschließliche Toxizität von Radikalen konnte mit der Entdeckung, daß  $\text{NO}^\cdot$  an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt ist, widerlegt werden [359, 225]. Die gut bekannten Wirkungen von Stickstoffmonoxid reichen mittlerweile von der Regulation des Sauerstofftransports und Verbrauchs, des Zellwachstums, über Neurotransmission bis hin zur Toxizität. Gerade für dieses Molekül besteht noch immer eine Ambivalenz zwischen toxischen und schützenden Wirkungen. Endothelzellen produzieren  $\text{NO}^\cdot$  entweder über eine konstitutive  $\text{Ca}^{2+}$ - und phosphorylierungsabhängige NO-Synthase (eNOS = Typ 3), oder über eine induzierbare Typ 2 NOS (= iNOS). Nach bisherigen Untersuchungen ist eine Typ 1 NOS (= nNOS) oder auch die Sonderform einer muskulären  $\mu\text{NOS}$  in Endothelien nicht vorhanden. Über das Vorhandensein und die Funktion einer speziellen mitochondrialen NOS gibt es in Endothelien noch keine Untersuchungen [164]. Direkte biochemische Interaktionen von  $\text{NO}^\cdot$  sind mit metallkomplexbhaltigen Proteinen,  $\text{O}_2$  und anderen reaktiven Sauerstoffderivaten bekannt und führen in der Summe zu Oxidationen, Nitrosationen und Nitrationen. Relevante Konzentrationen in vivo wurden von nanomolar bis zu  $100\text{ }\mu\text{M}$  geschätzt [444].  $\text{NO}^\cdot$  reagiert direkt mit Oxyhämoglobin ( $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ ) zu Methämoglobin ( $\text{Fe}^{3+}$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), dem

Hauptabbauprodukt im Blut [276]. In Lipidmembranen steigt die Löslichkeit von  $\text{NO}^\bullet$  um das 6-7fache und da auch  $\text{O}_2$  lipophil ist findet die Autooxidation über  $\text{NO}_2$  und  $\text{N}_2\text{O}_3$  zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) vorwiegend in Membranen statt [295, 309]. Das Intermediärprodukt  $\text{N}_2\text{O}_3$  scheint hauptverantwortlich für N- oder S-Nitrosylierungen und damit für die Bildung von Nitrosaminen oder Nitrosothiolen zu sein. Nitrosothiol-addukte können als eine zirkulierende Quelle für  $\text{NO}^\bullet$  dienen [447, 446]. Ob Nitrosothiole selbst direkte Mediatoren biologischer Wirkungen sind ist nicht bekannt. Tyrosyl- und Tryptophanyl-Radikale an Proteinen können ebenfalls wichtige Zielstrukturen für  $\text{NO}^\bullet$  sein [188].

$\text{NO}^\bullet$  hat offensichtlich noch unterschiedliche Redoxformen, die unterschiedliche biologische Wirkungen zur Folge haben. So kann das Nitroxyl-Anion ( $\text{NO}^-$ ), aber auch das Nitrosonium-Ion ( $\text{NO}^+$ ) in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedliche Reaktionen zeigen [294, 517, 305, 246].

1990 berichteten Beckman et al. [39], daß die Anwesenheit von sowohl  $\text{NO}^\bullet$  als auch  $\text{O}_2^{\bullet-}$  zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) führt. Die Hälfte des  $\text{ONOO}^-$  äquilibriert zu der konjugierten Säure  $\text{ONOOH}$  und zerfällt zu  $\text{NO}_3^-$  oder  $\text{NO}_2^-$  [374]. Die andere Hälfte kann zu einem dem  $\text{HO}^\bullet$  ähnlichen Radikal zerfallen. Die biologischen Effekte dieser Reaktion sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen seither. Eine spezielle enzymatische Quelle für die Produktion von  $\text{ONOO}^-$  ist bisher noch nicht beschrieben worden, sodaß angenommen werden kann, daß die schnelle Reaktion zwischen  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und  $\text{NO}^\bullet$  ( $\sim 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) entscheidend ist. In vivo scheint  $\text{ONOO}^-$  sehr schnell über eine Reaktion mit  $\text{CO}_2$  weitere Reaktionen zu bestimmen [401]. Peroxynitrit reagiert stark u.a. mit SH-Gruppen und Phospholipiden [119], auch eine Nitrosothiolbildung ist beschrieben [401]. Darüber hinaus reagiert  $\text{ONOO}^-$  aber auch in mit den Radikalen aus denen es entsteht. Dabei scheinen die individuellen Produktionsraten von  $\text{NO}^\bullet$  oder  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ebenfalls die Wirkungen von  $\text{ONOO}^-$  zu bestimmen [184]. Die Nitration von Tyrosinresten durch Peroxynitrit wurde von einigen Autoren als hilfreicher Marker für eine  $\text{ONOO}^-$  Produktion in vivo beschrieben [261, 190], anderen Autoren zufolge scheinen Nitrotyrosine wahrscheinlicher über  $\text{NO}_2$  als über  $\text{ONOO}^-$  zu entstehen [375] und repräsentieren eher ein generelles Maß für Nitration [193].



## II. Zielsetzung

Mittlerweile ist eine enorme Anzahl von Krankheitszuständen mit der Dysregulation von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen assoziiert. Die fast klassischen Bereiche der „Radikal“-Forschung reichen von Alterungsprozessen per se bis hin zur Karzinogenese, da sowohl reaktive Sauerstoffderivate als auch reaktive Stickstoffderivate die DNS schädigen können. Neuere Untersuchungen zeigen, daß bei nahezu allen Erkrankungen, bei denen Gefäße beteiligt sind, eine Dysregulation reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate vorliegt. Eine solche Dysregulation kann für die Arteriosklerose, die Hypertonie und den Diabetes in weiten Bereichen gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wird nun der Versuch unternommen die Bedeutung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate für endotheliale Funktionen, die bei der Pathogenese der Sepsis eine Rolle spielen können, zusammenzustellen.

Da beide Molekülgruppen primär als toxische Abfallprodukte betrachtet wurden werden im Teil IV.1. Untersuchungen und Mechanismen dargestellt, die nach der Exposition reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate im Hinblick auf toxische Wirkungen in Endothelzellen beschrieben sind. Hierbei werden toxische Wirkungen zunächst als unspezifisch im Sinne der Onkose verstanden. Zahlreiche Tiermodelle zur Sepsis beschreiben toxische Wirkungen auf Endothelzellen. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf Menschen ist problematisch.

Daneben kann der Tod einer Zelle auch als eine teleologisch sinnvolle Form geregelt eintreten. Dieser sogenannte programmierte Zelltod, die Apoptose, ist Gegenstand im Teil IV.2. Aus zahlreichen anderen Zelltypen ist bekannt, daß reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate Apoptose induzieren können. Andererseits weist die protektive Wirkung antioxidativer Substanzen bei anderen Induktoren der Apoptose auf eine Mediatorfunktion im Sinne eines second messenger für den Sterbeprozess hin. Auch für diesen Sterbeprozess existieren tierexperimentelle Daten, die eine Apoptose in Endothelzellen stützen. Ob eine durch Sepsis induzierte endotheliale Apoptose für Menschen vorliegt wird diskutiert.

Unabhängig von Apoptose liegen eine ganze Reihe von Untersuchungen vor, die eine signalgebende Funktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate belegen und als physiologisch betrachtet werden kann. Im Teil IV.3. wird hierzu eine Übersicht über signalgebende Eigenschaften in Endothelzellen gegeben, die nach exogener Zugabe reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate aber auch durch eine endogene Produktion bekannt wurden und Endothelien in ihrer Funktion regeln.

Zu den speziellen biologischen Funktionen von Endothelzellen zählt die Regulation der Gerinnung, der Gefäßpermeabilität, der Interaktion mit zirkulierenden Zellen, des Gefäßtonus und des Sauerstoffverbrauchs. Von all diesen Funktionen wird vermutet, daß sie bei septischen Patienten gestört, oder aktiviert sind. Im Teil IV.4. werden daher Untersuchungen zusammengefasst, die die Hypothese einer endothelialen Dysfunktion unter dem Blickwinkel der Pathogenese der Sepsis stützen. Zunächst wird dargestellt, daß zahlreiche pathogene Erreger, oder deren Sekretions-, bzw. Abbauprodukte primär mit Endothelzellen interagieren können. Bereits diese frühen Interaktion gehen mit einer Dysregulation reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate einher (IV.4.1.). Die Interaktion zirkulierender Zellen mit Endothelien ist sehr komplex. Die vermehrte Adhäsion von Leukozyten in mikrovaskulären Modelluntersuchungen läßt sich zwar regelhaft induzieren und dabei scheinen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate ebenfalls Mediatorfunktionen zu besitzen. Dennoch ist ein solcher Vorgang bei Menschen nur fragmentarisch untersucht und das klinische Bild einer Sepsis unterscheidet sich wahrscheinlich an diesem Punkt deutlich von tierexperimentellen Modellen (IV.4.2.). Patienten mit einer Sepsis zeigen eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung, die über ein in vitro leicht aktivierbares Endothel erklärbar sein könnte. Ob diese Vorstellung so auf den Menschen übertragbar ist, ist unklar (IV.4.3.). Vor allem im Rahmen eines früh auftretenden septischen Schocks wird eine enorm erhöhte Gefäßpermeabilität deutlich. Untersuchungen zur endothelialen Permeabilität legen zumindest in vitro eine Dysregulation reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate nahe (IV.4.4.). Die Regulation des Gefäßtonus ist ganz offensichtlich bei septischen Patienten gestört. Welcher Beitrag hierfür auf eine gestörte Endothelfunktion zurückzuführen ist wurde in zahlreichen tierexperimentellen Modellen untersucht. Die Ergebnisse unterstreichen erneut den Einfluß reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate auch in therapeutischer Hinsicht (IV.4.5.). Endothelzellen sind

offensichtlich in der Lage, den Sauerstoffverbrauch ganzer Organe zu regeln. Implikationen für die Pathophysiologie der Sepsis liegen also auch hier nahe (IV.4.6.). Als wesentlich für das Scheitern von antiinflammatorischen Sepsisstudien in der Vergangenheit kann die Erkenntnis angesehen werden, daß eine phasische Veränderung septischer Patienten existiert. Patienten mit Sepsis sind also nicht aufgrund der klinischen Kriterien notwendigerweise in einem hyperinflammatorischen Zustand, vielmehr kann eine Hypoinflammation mit Immunparalyse führend sein [264]. Dieser Zustand ist charakterisiert durch eine verminderte Reagibilität auf einen möglicherweise pathologischen Stimulus. Daß Endothelzellen nach einer proinflammatorischen Behandlung ebenfalls in eine Hyporeagibilität überführt werden ist Gegenstand im Teil IV.4.7.

### III. Material und Methoden

#### *Endothelzellen*

ECV 304 wurde von der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, CERDIC, Sophia Antipolis, Frankreich) erworben [498]. EA.hy926 erhielten wir von Dr. H.-D. Orzechowski, Berlin, mit Genehmigung von Prof. Dr. C.-J. S. Edgell, Chapel Hill, North Carolina, USA [123]. LEC erhielten wir von PD Dr. U. Rauen und Prof. Dr. Dr. H. de Groot, Essen [395]. Humane endotheliale Primärzellen aus einer peripheren Vene erhielten wir dankenswerterweise von PD Dr. H. Laube, Berlin.

Die Zelllinien wurden bei 37°C (21% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) in RPMI-Medium (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), supplementiert mit fötalem Kälberserum (10%, Sigma), Glutamin (2 mM, Gibco, Eggenstein, Germany), Penicillin (100 U/ml, Sigma) und Streptomycin (100 µg/ml) in beschichteten (Fibronectin, Sigma) Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Germany) subkultiviert.

#### *Chemikalien*

3-morpholinosydnonimine-*N*-ethylcarbamid (SIN-1, Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden/Ts., Deutschland), 4-hydroxy-Tempo (Tempol, Sigma), Adenosintriphosphat (ATP, Boehringer, Mannheim, Deutschland), bis-(2-amino-5-methylphenoxy)ethan-*N,N,N',N'*-tetraacetosäure-tetraacetoxymethylester (MAPT/AM; Calbiochem-Novabiochem), bis-(*o*-aminophenoxy)-*N,N,N,N'*-tetraacetosäure-acetoxymethylester (BAPT/-AM; Calbiochem-Novabiochem), Br A23187 (Calbiochem-Novabiochem), Dichloro-dihydrofluorescein (H<sub>2</sub>DCF, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), Dichlorodi-hydrofluorescein diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes), Dihydrorhodamin 1,2,3 (DHR123, Molecular Probes), Diltiazem (Calbiochem-Novabiochem), Dimethyl-formamid (Sigma), Diphenyliodonium (DPI, Sigma), Ethylenglycol-bis(β-amino-ethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetsäure (EGTA, Merck, Darmstadt, Deutschland), FURA2-AM (Molecular Probes, Calbiochem-Novabiochem), Glukoseoxidase (GO, Grad II, Boehringer), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Deutschland), Histamin (Sigma), IFN-γ (Boehringer, Mannheim), IL-1β (Boehringer, Mannheim), IL-4 (Boehringer, Mannheim), Katalase (CAT; aus Rinderleber; 65.000 U/mg, Boehringer), KT5823 (Calbiochem-Novabiochem), LPS (E. coli 0127:B8,

Sigma), LY 83583 (Calbiochem-Novabiochem), Natrium-Nitroprussid (NP, Fluka, Sigma), N-Methyl-L-Arginin (NMMA, Sigma), Pertussistoxin (Sigma), o-Phenanthrolin (Sigma), Propidiumjodid (Sigma, Calbiochem-Novabiochem), Ryanodin (Calbiochem-Novabiochem), SKF 96365 (Calbiochem-Novabiochem), S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin (SNAP, Calbiochem), Superoxid-dismutase (SOD; 5000 U/mg, Boehringer), Thapsigargin (Calbiochem-Novabiochem), Tiron (4,5-Dihydroxy-1,3-benzene-disulfonic acid, Sigma), TNF- $\alpha$  (Boehringer, Mannheim), TMB-8 (Calbiochem-Novabiochem), U73122 (Calbiochem-Novabiochem), Xanthinoxidase (XO, Boehringer, Mannheim, Germany).

### *Messung der Vitalität*

Die Vitalität der Zellen wurde anhand verschiedener Parameter überprüft. Die Exklusion des Farbstoffs Trypanblau [498], die Freisetzung der zytoplasmatischen Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH, kit tox-7, Sigma) [495], die mitochondriale Tetrazoliumreduktionskapazität (EZ4U<sup>®</sup>, Biozol, Eching, Deutschland) [497] und die Anfärbbarkeit des nicht permeablen DNS-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumjodid [495] wurden hierfür benutzt.

### *Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration*

Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen wurden über eine Fluoreszenzmessung von FURA2 durchgeführt. Die Beladung der Zellen erfolgte über 30 Minuten bei 37°C mit 1  $\mu$ M FURA2-AM. Die Einzelzellemissionsmessungen erfolgten entweder an einem Inversionsmikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland) mit einer wechselfiltergesteuerten Fluoreszenzquelle (30 Hertz) und einer Quantifizierung über einen Photomultiplier [345], oder an einem Inversionsmikroskop (DMIRB, Leica) mit über einen Monochromator erzeugten Fluoreszenz, wobei die Emission über eine CCD-Kamera digital mit 2 Hertz registriert wurde (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Deutschland) [495].

### *Reaktive Sauerstoffderivate*

Die Exposition mit reaktiven Sauerstoffderivaten erfolgte mit enzymatischen und nicht-enzymatischen Systemen. Zur Produktion von Superoxid wurde das Hypoxanthin-Xanthinoxidasesystem benutzt [498, 495]. Zur Produktion

von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde Glukseoxidase in Anwesenheit von Glukse [498] oder Wasserstoffperoxidlösung benutzt. Zur Messung der Produktion reaktiver Sauerstoffderivate auf Einzelzellniveau wurde eine mikrofluorimetrische Methode unter Verwendung von Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat benutzt [198, 408, 494, 497]. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte über ein digitales Bildanalyseystem einer CCD-Kamera (T.I.L.L. Photonics).

#### *Reaktive Stickstoffderivate*

Die Exposition der Zellen mit reaktiven Stickstoffderivaten erfolgte über chemische  $\text{NO}\cdot$ -Donatoren SNAP, SIN-1, NP, GSNO und SNOG. Die Quantifizierung einer  $\text{NO}\cdot$  Produktion erfolgte über die Messung von  $\text{NO}_2^-$  anhand der Griess-Reaktion und über eine Mikrofluoreszenztechnik [255, 337].

#### *Messung von MCP-1, IL-6 und IL-8*

Kommerziell erhältliche Enzymimmunoassays wurden benutzt um MCP-1 (Quantikine<sup>®</sup> human MCP-1, R&D systems, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Germany), IL-6 (Milenia<sup>®</sup> IL-6, DPC Biermann GmbH), IL-8 (Milenia<sup>®</sup> IL-8, DPC Biermann GmbH) im Überstand nach den Angaben des Herstellers zu messen.

#### *Statistische Angaben*

Um gemessene Werte verschiedener Gruppen miteinander zu vergleichen wurden deskriptive Parameter (Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler) berechnet. Unterschiede wurden nach Tests zur Normalverteilung einer Varianzanalyse unterzogen. Der Student-Newman-Keuls Test wurde benutzt um individuelle Ergebnisse mit der jeweiligen Kontrolle zu vergleichen. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant betrachtet.

## IV. Ergebnisse

### IV.1. Onkose durch exogene reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies in Endothelzellen

#### IV.1.1. Reaktive Sauerstoffderivate

Prinzipiell galten Radikale als zu reaktiv und unselektiv um eine zielgerichtete Interaktion mit zellulären Strukturen oder Molekülen eingehen zu können. Daher standen zunächst schädigende Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen. Zellen scheinen allerdings grundsätzlich auf unterscheidbare Weise sterben zu können. Onkose bezeichnet die Todesform, bei der Zellen so geschädigt werden, daß sie ihre Membranintegrität verlieren und intrazelluläre Bestandteile austreten. Zu den entscheidenden Zielstrukturen reaktiver Sauerstoffderivate für toxische Prozesse zählen DNS, RNS, Proteine und vor allem Lipide. Wenn die Lipidmembran von Endothelzellen geschädigt wird steigt deren Permeabilität. Klassische Untersuchungen nutzen einen solchen Membranpermeabilitätsanstieg zur Quantifizierung endothelialer Schädigungen (z.B. über einen Verlust von mit  $^{51}\text{Cr}$  beladenen Zellen, dem Verlust intrazellulärer Laktatdehydrogenaseaktivität oder der zytoplasmatischen Anfärbbarkeit mit nicht permeablen Farbstoffen). Ungesättigte Fettsäuren der Zytoplasmamembran reagieren mit reaktiven Sauerstoffderivaten und führen über komplexe Degradationen zu einer Fülle von Lipidperoxidationsprodukten, die wiederum biologisch aktiv sind. Zu den besser charakterisierten Produkten, die Endothelzellen somit auch sekundär schädigen können zählen u.a. 4-OH-Nonenal [200], Malondialdehyd [134], oder Isoprostan [281]. Bei der Exposition von unterschiedlichen Endothelzelltypen mit  $\text{O}_2^{\cdot-}$  generierenden, oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  generierenden Systemen scheinen toxische Wirkungen primär über einen Eisen- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abhängigen Schritt zustande zu kommen [202, 461, 488]. Die meisten der endothelialen Untersuchungen benutzen als Hinweis auf einen solchen Mechanismus die protektive Wirkung von permeablen Metallchelatoren, oder Substanzen, von denen eine gewisse präferentielle Fängerfunktion gegenüber dem  $\text{OH}^{\cdot}$ -Radikal ausgehen.

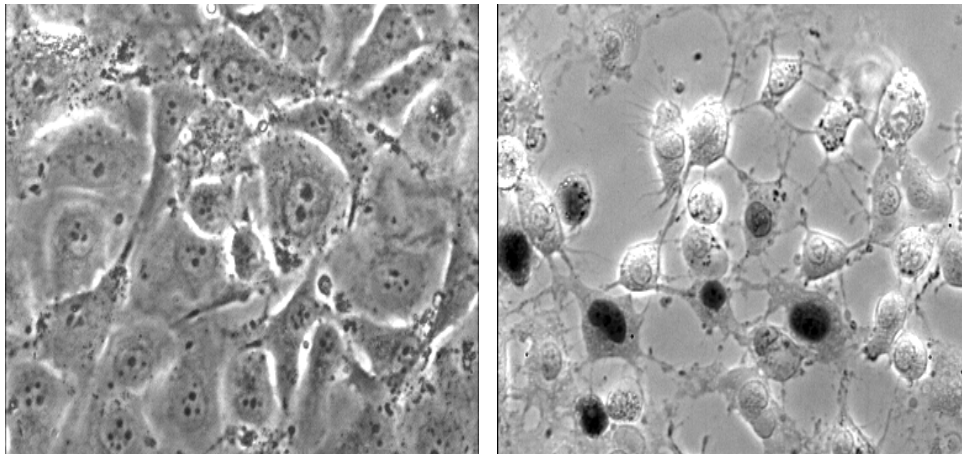


Abb. 1: Morphologische Veränderungen in Endothelzellen nach Exposition mit einem Superoxid-produzierenden Enzymsystem.

Links: nicht behandelte Kontrollkultur. Rechts: Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden über 6 h mit Xanthinoxidase (10 mU/ml) in Anwesenheit von Hypoxanthin (1mM) inkubiert. Die Schwärzung zeigt Zellen, die mit Trypanblau anfärbbar sind und damit den Verlust der Membranintegrität.

Die Exposition von Endothelzellen mit reaktiven Sauerstoffderivaten führt in zahlreichen Untersuchungen zu Phosphorylierungen des Leichtketten-Myosins und damit zu einer Aktin-Reorganisation im Zytoskelett. Morphologisch hat dies unterschiedliche Veränderungen zur Folge. Interzelluläre Verbindungen werden gelöst und eine aktive Kontraktion erzeugt Lücken, die relevant für eine erhöhte endotheliale Permeabilität sein können [299, 462] (Abb. 1).

An der Zytoplasmamembran können Bläschen auftreten. Dieses sogenannte „membrane blebbing“ scheint morphologisch ähnlich den Abschnürungen von Endothelzellmembranteilen zu sein, die aufgrund apoptotischer Prozesse induzierbar sind (siehe Teil IV). Allerdings fehlen in den durch Zugabe von exogenen Peroxiden induzierten Membranblasen die typischen Veränderungen apoptotischer Zellen [487] (Abb. 2). Die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in Endothelzellen liegt im Bereich von etwa 100 nM, d.h. es besteht ein sehr hoher Gradient zur normalen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ). Hohe Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffderivaten schädigen die DNS über Strangbrüche und Quervernetzungen und induzieren gleichzeitig Reparaturprozesse unter sehr hohem ATP-Verbrauch.



Mit dem Verlust von ATP [442] und auch der Inaktivierung ATP-produzierender Systeme [221] brechen letztlich alle ATP-getriebenen Ionengradienten zusammen. Konsequenterweise können dann erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte gemessen werden [127, 112] (Abb. 3).

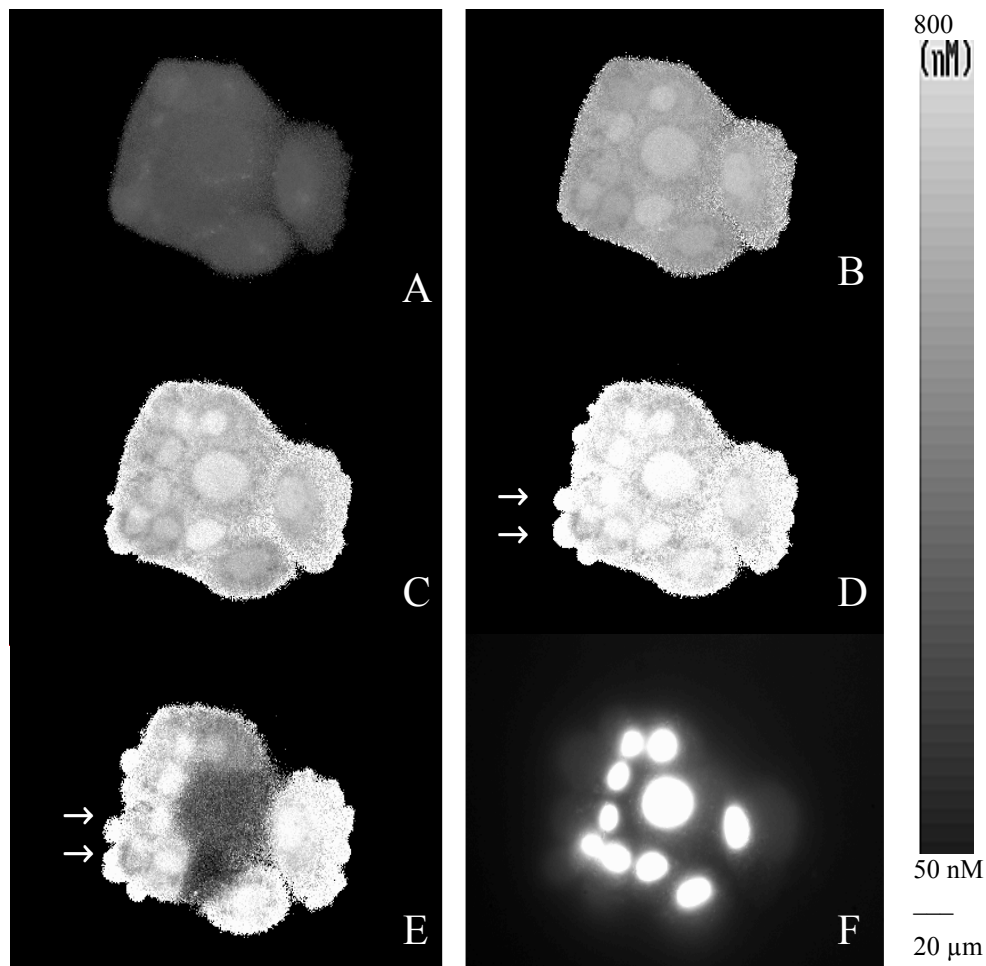


Abb.2: Intrazelluläre Änderung der Kalziumkonzentration und "membrane blebbing" in Endothelzellen nach Zugabe von  $O_2^-$ .

Mikrovaskuläre Endothelzellen der Rattenleber wurden auf Glasplättchen kultiviert und mit FURA-2, einem  $Ca^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenz-farbstoff beladen. Anschließend wurden die Zellen in eine spezielle Meßkammer überführt und die Fluoreszenz mit einer digitalen Kamera aufgenommen. In (A) sind in einer Falschfarbendarstellung die Ruhebedingungen wiedergegeben. 15 Minuten nach Exposition mit 10 mU/ml XO (+1 mM HX) werden leichte Anstiege der zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration erkennbar und nach 25 (C), 35 (D) und 45 Minuten (E) erkennt man kleine Blasenbildungen an der Zytoplasmamembran als Hinweis einer Schädigung (blebs, Pfeile). In diesen Blasen werden die höchsten  $Ca^{2+}$ -Werte gemessen. In (F) wurde den Zellen ein DNA-Farbstoff zugegeben, der normalerweise nicht permeabel ist (Propidiumjodid) und zeigt, daß die Zytoplasmamembran zerstört ist.

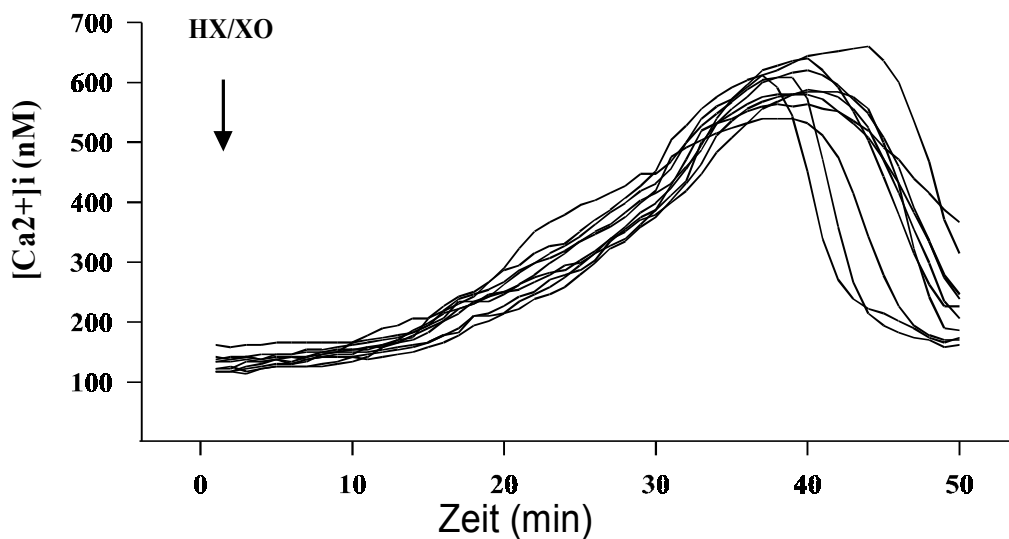


Abb. 3: Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Endothelzellen unter dem Einfluß toxisch wirkender reaktiver Sauerstoffderivate.

Dargestellt sind Messungen der FURA-2 Fluoreszenz über Einzelzellen nach der Inkubation mit XO (10mU/ml) in Anwesenheit von Hypoanthin (1mM). In sterbenden Zellen steigt die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration langsam an. Der spätere Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist auf einen Verlust des zytoplasmatischen Farbstoffs zurückzuführen und geht mit der Lyse der Zellmembran einher.

Die schädigenden Wirkungen hoch dosierter reaktiver Sauerstoffderivate wurden häufig primär in mitochondrialen Strukturen gefunden [347, 22] obwohl dort besondere Schutzsysteme vorhanden sind [13]. In neuesten Untersuchungen an Rattenleberendothelien konnte in Mitochondrien eine auffallend hohe “freie” Eisenkonzentration visualisiert werden [371] (Rauen und deGroot, Essen, pers. Kommunikation). Gerade die mitochondriale Lipidmembran scheint für toxische Wirkungen also ein relevantes Ziel darzustellen. Passend hierzu finden sich auch früh in endothelialen Mitochondrien deutliche Strukturveränderungen nach Exposition mit reaktivem Sauerstoff (Abb. 4). Eine mitochondriale genomische Schädigung in HUVEC nach wenigen Minuten kann so deutlich werden [29].

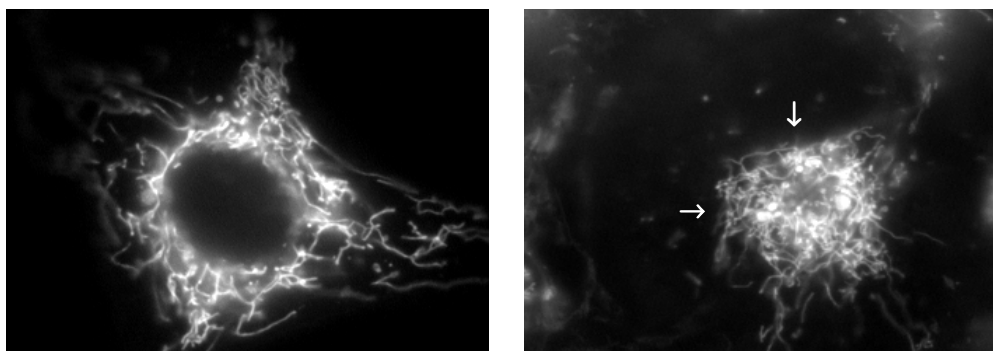


Abb. 4: Mitochondriale Schädigung nach Exposition mit toxischen Konzentrationen reaktiver Sauerstoffderivate.

Links wurden ECV 306 Zellen mit dem lipophilen kationischen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 1,2,3 (30 min, 0,5 µg/ml) inkubiert. Im rechten Bild erkennt man deutlich typische mitochondriale Strukturveränderungen nach Exposition von 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  über 20 Minuten.

Onkotische Prozesse gehen im Gegensatz zur Apoptose eher mit einer Volumenzunahme einher. Werden Endothelzellen mit hohen Konzentrationen reaktiver Sauerstoffderivate inkubiert, so nimmt deren Volumen, gemessen am intrazellulären Wassergehalt, katalasesensitiv innerhalb einer Stunde zu [199] (Abb.5). Diese Veränderungen sprechen damit auch gegen einen apoptotischen Prozess.

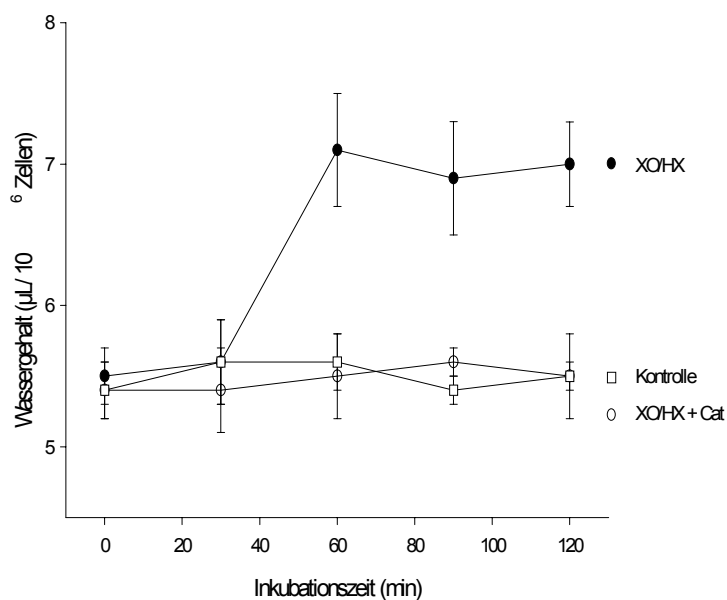


Abb. 5: Volumenänderungen in Endothelzellen nach Inkubation mit  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

Monolayer wurden über die angegebene Zeit mit Xanthinoxidase (XO, 5 mU/ml) in Anwesenheit von 1mM Hypoxanthin inkubiert (●). Bereits nach 1 h steigt der Wassergehalt der Zellen an. Bei nicht behandelten Kontrollkulturen (□) oder bei Koinkubation mit Katalase (50 U/ml, ○) treten diese Volumenzunahmen nicht auf.

#### IV.1.2. Reaktive Stickstoffderivate und Kombinationen

Zu den zellulären Zielstrukturen für toxische Reaktionen von primär gebildetem  $\text{NO}^\bullet$  zählt die Inhibition der Cytochrom C Oxidase über die Bindung an Eisen II der Hämgruppe [85], die Inhibition der Katalase [137] und direkte Schäden an der DNS [519]. Bei Experimenten mit chemischen  $\text{NO}^\bullet$ -Donatoren wie z.B. Nitroprussid (NP), *S*-Nitroso-*N*-acetyl-penicillamin (SNAP), 3-morpholinosydnnonimine-*N*-ethylcarbamid (SIN-1) und anderen Substanzen sind toxische Wirkungen auch von den Umgebungsbedingungen abhängig. Zu diesen Umgebungsbedingungen zählt z.B. der Sauerstoffpartialdruck. Werden Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen  $\text{NO}^\bullet$ -Donatoren ausgesetzt, so kann eine erhöhte Toxizität von Nitroprussid und SNAP, nicht aber von SIN-1 festgestellt werden (Abb. 6) [229].

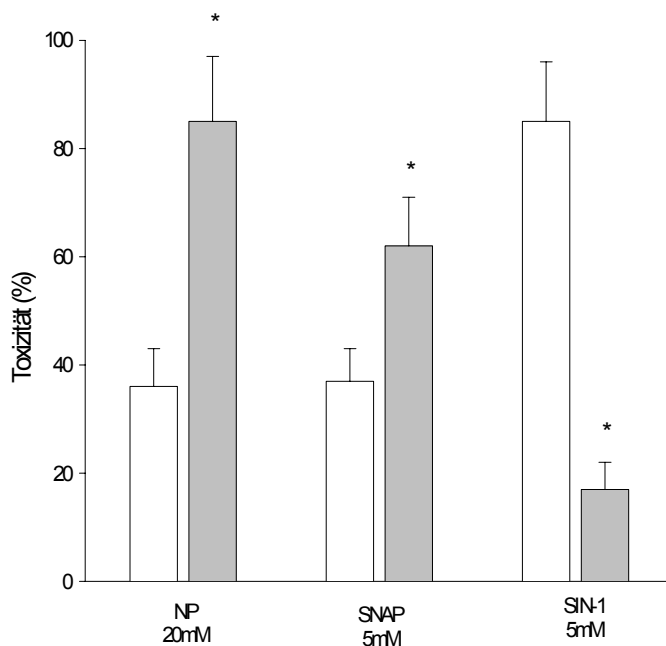


Abb. 6:  
Einfluß einer Hypoxie  
auf toxische Wirkungen  
von  $\text{NO}^\bullet$ -Donatoren.

Nitroprussid (NP), SNAP und SIN-1 wurden über 6 h mit Endothelzellen inkubiert (weisse Balken). Toxizität wurde über die Freisetzung von LDH-Aktivität quantifiziert, wobei 100% der Aktivität lysierter Zellen entspricht. Hypoxische Bedingungen (graue Balken) wurden über einen Austausch von begastem Puffer ( $\text{CO}_2:\text{N}_2$ , 1:19) und nachfolgender Begasung alle 2 h erreicht. (\*  $P < 0,01$  vs. normoxische Kontrolle).

Die Arbeitsgruppe von de Groot konnte über Elektronenspinresonanz-Messungen von cheletropischen  $\text{NO}^\bullet$ -Fängern weiterhin zeigen, daß unter hypoxischen Bedingungen sowohl aus NP, als auch aus SNAP mehr  $\text{NO}^\bullet$  freigesetzt wird [227]. Von SIN-1 war bereits bekannt, daß für die Freisetzung von  $\text{NO}^\bullet$

molekularer Sauerstoff notwendig ist [140]. Hält man allerdings die Syntheseraten von  $\text{NO}^\bullet$  gleich, sinkt die Toxizität unter hypoxischen Bedingungen, sodaß in Anwesenheit von  $\text{O}_2$  die Reaktion von  $\text{O}_2$  mit  $\text{NO}^\bullet$  über die Bildung von  $\text{NO}_2^\bullet$  bedeutsam werden kann.

Bei der sogenannten chemischen Hypoxie wird die mitochondriale Atmungskette blockiert. Zu den hierfür oft benutzten Substanzen zählt  $\text{CN}^-$ , das Cytochromoxidasen in der dreiwertigen Stufe inhibiert, Antimycin A, das den Elektronentransport im Ubichinon-Cytochrom  $\text{bc}_1$  des Komplex III inhibiert und Rotenon, das den Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel Zentrum des NADH-Dehydrogenasekomplexes zu Ubichinon im Komplex I blockiert. Unter diesen Bedingungen wird die endotheliale Toxizität von SNAP und auch NP deutlich verstärkt (Abb. 7).

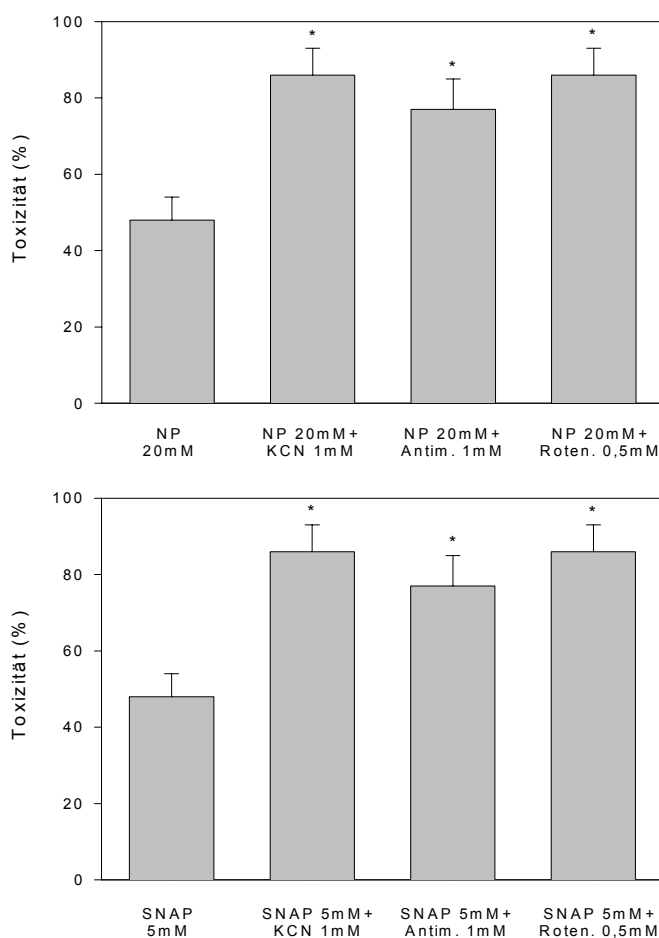


Abb. 7:  
Toxizität von  $\text{NO}^\bullet$ -Donatoren unter Hemmung der mitochondrialen Atmungskette.

Oben: Endothelzellen wurden über 6 h mit NP, oder zusätzlich KCN, Antimycin A oder Rotenon in der angegebenen Konzentration inkubiert.

Unten: Endothelzellen wurden über 6 h mit SNAP, oder zusätzlich KCN, Antimycin A oder Rotenon in der angegebenen Konzentration inkubiert. Angegeben sind LDH-Aktivitäten ( $\% \pm \text{SEM}$ ) als Maß für die Toxizität nach jeweils 5 unabhängigen Versuchen. (\*  $P < 0,01$  ANOVA vs. Donator alleine).

Exogenes und auch endogen produziertes  $\text{NO}^\bullet$  hemmt in sehr geringen Konzentrationen die mitochondriale Cytochrom C Oxidase [86, 282], wobei dies allein zu toxischen Prozessen beitragen könnte. Die Hemmung der ATP-Produktion nach Blockade der Atmungskette hemmt natürlich endogene energieabhängige Reparaturprozesse, darüber hinaus wird auch mehr Superoxid produziert, da der Elektronentransport nur inkomplett abläuft [223]. Geht man von einer vermehrten  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion aus, so führt die Zugabe von  $\text{NO}^\bullet$  wahrscheinlich sehr schnell zu  $\text{OONO}^\bullet$ . Da die Reaktionskonstante der  $\text{OONO}^\bullet$ -Bildung aus  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und  $\text{NO}^\bullet$  etwa dreimal so schnell verläuft, wie die Reaktion von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  mit SOD [220] betrachten einige Toxikologen die chemischen Wirkungen von  $\text{OONO}^\bullet$  bedeutsamer als eine metallkatalysierte  $\text{HO}^\bullet$ -Radikalbildung [262].

Konsequenterweise zeigen die  $\text{NO}^\bullet$ -Donatoren SNAP und NP mit einem Superoxid produzierenden System (XO/HX) additive Toxizität (Abb. 8). Inkubiert man nun aber zusätzlich mit SOD im Überschuß unter der Vorstellung das vorhandene  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu dismutieren, so wird diese additive Toxizität nur unwesentlich reduziert. Der Zusatz von Katalase hingegen führt zu einem deutlichen protektiven Effekt (Abb. 9). Mit der Reduktion des gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nicht aber von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  scheint also ein Schutzeffekt verbunden zu sein.

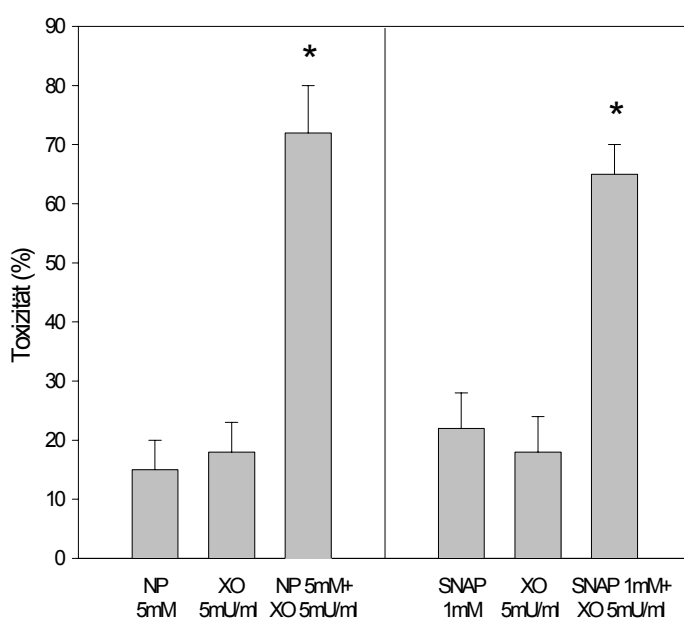


Abb. 8:  
Synergistische Wirkung der Toxizität von  $\text{NO}^\bullet$  und reaktivem Sauerstoff. Endothelzellen wurden mit NP, SNAP, XO in Anwesenheit von Hypoxanthin (1mM), oder kombiniert über 6 h inkubiert. Die kombinierte Gabe der  $\text{NO}^\bullet$ -Donatoren und des  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -produzierenden Systems ist deutlich verstärkt. Freisetzung von LDH-Aktivität aus 4 unabhängigen Versuchen bestimmt und angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. (\*  $P < 0,01$  ANOVA)

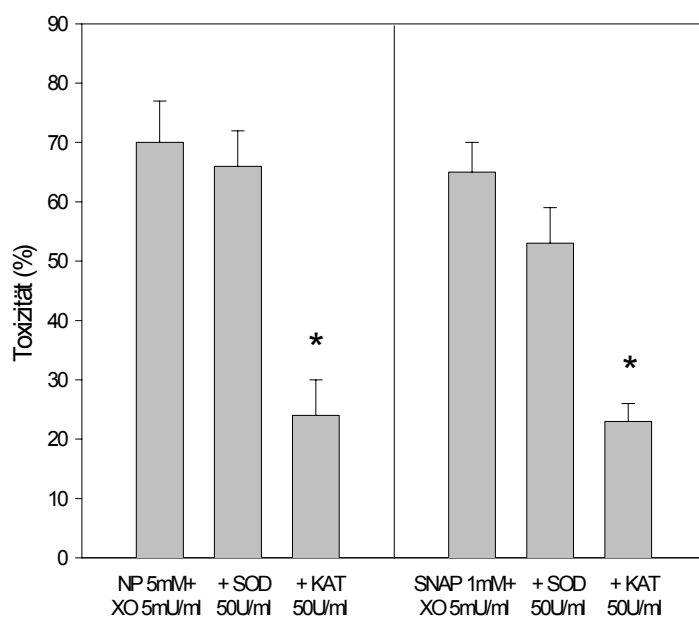


Abb. 9:  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  verstärkt die toxischen Wirkungen von  $\text{NO}^\cdot$ -Donatoren. Endothelzellen, die mit  $\text{NO}^\cdot$  und  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -produzierenden Systemen über 6 h inkubiert werden, werden in Anwesenheit von SOD im Gegensatz zur Katalase nicht geschützt. Toxizität wurde über die Freisetzung von LDH-Aktivität aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen bestimmt und angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. (\*  $P < 0,01$  ANOVA)

SIN-1 produziert in Anwesenheit von Sauerstoff nicht nur  $\text{NO}^\cdot$ , sondern auch  $\text{O}_2^{\cdot-}$  und wird daher als  $\text{ONOO}^\cdot/\text{ONOOH}$  Donator benutzt. Toxische Wirkungen, die SIN-1 in Endothelzellen ab etwa  $500\mu\text{M}$  produziert, werden kaum durch SOD, deutlich allerdings durch Katalase inhibiert (Abb. 10).

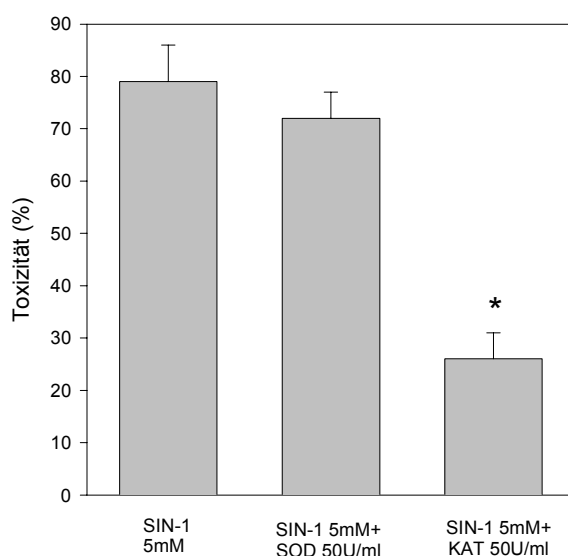


Abb. 10:  
 Reduktion der  $\text{ONOO}^\cdot/\text{ONOOH}$  induzierten Toxizität durch Katalase.

Endothelzellen wurden über 6 h mit SIN-1, oder zusätzlich mit SOD, oder Katalase inkubiert. Toxizität wurde über die Freisetzung von LDH-Aktivität aus 3 unabhängigen Versuchen bestimmt und angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. (\*  $P < 0,01$ ; ANOVA).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Toxizität gegenüber Endothelzellen, die aus einer Kombination zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{NO}^\cdot$  entsteht und weniger aus einem primär Peroxynitrit bedingten Prozess [498]. Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe von de Groot ebenfalls zeigen, daß Peroxynitrit mit NADH reagiert und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bildet [250].  $\text{NO}^\cdot$  kann mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  dem  $\text{OH}^\cdot$  ähnliche Moleküle bilden unabhängig von der Anwesenheit von Eisen und auch unabhängig von  $\text{O}_2^\cdot$  [338]. Synergistische Toxizität zwischen Peroxiden und  $\text{NO}^\cdot$  kann in RBEC [169], in HMLEC [339] und in BAEC [428] gefunden werden. Andererseits können  $\text{NO}^\cdot$  Donatoren eine  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Toxizität in RAEC [102], RLMEC [75] und in PPAEC [189] mindern. Die Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnte auf unterscheidbare konzentrationsabhängige Reaktionspräferenzen hinweisen. Dies würde bedeuten, daß  $\text{NO}^\cdot$  in hohen Konzentrationen eher mit anderen reaktiven Sauerstoffderivaten mit  $\text{O}_2$  über  $\text{NO}_2^\cdot$  [227], mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  über  $\text{HO}^\cdot$  [338] oder mit  $\text{O}_2^\cdot$  zu  $\text{OONO}^\cdot$  [39] zu toxischen Reaktionen führt, wohingegen  $\text{NO}^\cdot$  in niedrigen Konzentrationsbereichen über die Reaktion mit Lipidperoxiden ( $\text{LOO}^\cdot$ ) oder die Bindung an Eisen zu Nitrosyl-Komplexen, oder eine verminderte Eisenfreisetzung [410] schützend wirkt (Abb. 11). Kürzlich publizierte Untersuchungen an einer Rattenhepatomzelllinie würden diese Hypothese stützen [237].

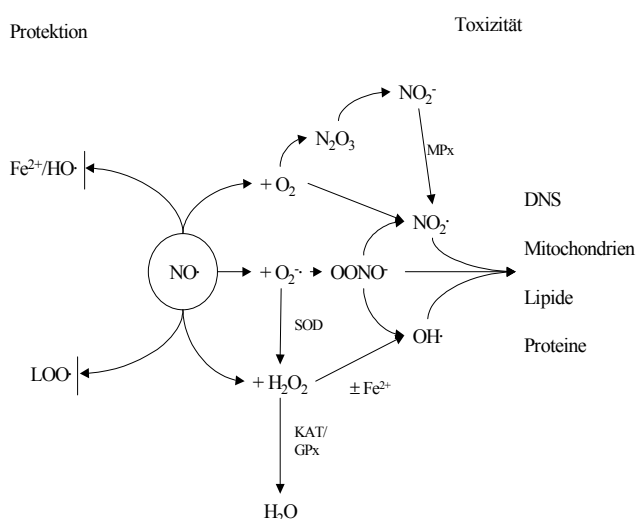


Abb. 11:  
Interaktionen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate für endotheliale Toxizität.

Angegeben sind Hauptreaktionen für bekannte zytotoxische (rechts) und zytoprotektive (links) Wirkungen von Stickstoffmonoxid gegenüber Endothelien im Zusammenspiel mit reaktiven Sauerstoffderivaten. SOD = Superoxiddismutase; MPx = Myeloperoxidase; Kat = Katalase; GPx = Glutathionperoxidase



Die Beurteilung endothelialer Schäden durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate wird in Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten, die potente Superoxidproduzenten sein können, noch komplexer. Aktivierte Neutrophile sezernieren Myeloperoxidase, die in der Lage ist  $\text{NO}_2^-$  in  $\text{NO}_2^\cdot$  zu überführen. Gleichfalls sezernierte Bleiche, das HOCl, könnte ebenfalls effektiv  $\text{HO}^\cdot$ -Moleküle in Anwesenheit von  $\text{O}_2^\cdot$  bilden [125, 69]. Darüber hinaus zeigen neutrophile Granulozyten erhöhte Produktionskapazitäten für  $\text{O}_2^\cdot$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wenn sie mit  $\text{NO}^\cdot$ -Donatoren präinkubiert werden [10]. Die Summe aller möglichen Interaktionen ist also nur schwer vorhersagbar [368].

Bisher auch nur in Ansätzen geklärt sind die komplexen Möglichkeiten bei der endogenen Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate, die in ihrer jeweiligen subzellulären Mikroumgebung deutliche Konzentrationsunterschiede aufweisen können. Eine endogene Produktion von  $\text{NO}^\cdot$  inhibiert bereits physiologischerweise den Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette. Ein zusätzliche Hemmung kann somit den normalen Elektronentransport abbrechen und eine Überproduktion von  $\text{O}_2^\cdot$  ähnlich wie Rotenon induzieren. Die Summe einer solchen Wirkung ist wahrscheinlich eine  $\text{OONO}^-$  bestimmte Reaktion und kann zu Toxizität führen [41].

Genauso unklar sind die Reaktionen auf einen subtoxischen Reiz mit der Produktion von Schutzsystemen. Subletale Schäden an der DNS können energieverbrauchende Reparaturenzyme aktivieren (z.B. Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und das Tumorsuppressorgen p53 einschalten. p53 blockiert den Zellzyklus wahrscheinlich um Zeit für die Reparatur zu gewinnen. Wenn nun diese energieverbrauchende Reparatur überlebt wird, kann eine nachfolgende Synthesesteigerung von z.B. Superoxiddismutase, Ferritin oder der Hämoxxygenase (HO-1) [147, 326, 530] gegenüber einer erneuten Schädigung durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate schützen. Eine Behandlung zur Induktion von Hitzeschockproteinen mit Wärme schützt ebenfalls vor einer nachfolgenden Schädigung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  [165]. Ähnliche Prozesse sind beispielsweise als ischämische Präkonditionierung aus Untersuchungen am Myokard bekannt und ebenfalls in Endothelzellen über eine Anoxie mit nachfolgender Reoxygenierung aufgezeigt worden [74, 38].

#### **IV.1.3. Endotheliale Onkose in der Sepsis ?**

Die Bedeutung dieser Toxizitätsuntersuchungen für Patienten mit Sepsis ist schwer zu beurteilen. In tierexperimentellen Studien können strukturelle Schäden an Endothelzellen gefunden werden. Vor allem in den 70er Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen publiziert, die endotheliale Toxizität nach LPS-Exposition beschreiben. Die generalisierte Schwarzmannreaktion wurde beispielsweise als Konsequenz einer endothelialen Schädigung nach LPS-Exposition betrachtet [159]. Endotheliale Ödeme als Vorstufe des nekrotischen Todes können im Myokard nach intraperitonealer Applikation von *E. coli* auftreten [438]. Mikrovaskuläre endotheliale Nekrosen sind tierexperimentell in der Leber [355], der Skelettmuskulatur [195], der Aorta und der Lunge [456] nach LPS-Behandlungen beschrieben. In anderen Arbeiten wurden die Effekte von LPS auch völlig unabhängig von einer toxischen Desquamation beschrieben [396]. Direkte toxische Effekte scheinen in Abhängigkeit von der Dosierung von LPS und v.a. der benutzten Tierspezies zu sein. Eine Übertragung dieser Untersuchungen auf Menschen ist schwierig. Einerseits scheint eine Endotoxinämie bei septischen Patienten nur sehr selten aufzutreten und ist schwer interpretierbar [87], andererseits ist die Exposition menschlicher Gefäße mit LPS nicht notwendigerweise mit strukturellen Veränderungen verbunden [44]. Die postmortal vorliegenden Untersuchungen an Menschen, die in einer Sepsis verstarben zeigen wahrscheinlich nicht eine generalisierte Zerstörung der Endothelzellen [210].

## **IV.2. Apoptose durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies in Endothelzellen**

### **IV.2.1. Endotheliale Apoptose durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate**

Die Apoptose bezeichnet eine Form des Sterbens, die geregelt, möglicherweise nach einem festen Programm, abläuft. Ein Suizidprogramm also, das unter bestimmten Bedingungen eingeschaltet werden kann. Sie steht der Onkose gegenüber, die oft als zellbiologischer Unfall betrachtet wird. Beide Formen münden letztlich in Nekrose [307, 285, 286]. Apoptotische Zellen schrumpfen isoosmotisch über einen  $K^+$ -Ausstrom [52], kondensieren ihr Chromatin (Pyknose), zeigen nukleäre Fragmentation (Karyorhexis) und eine reguläre DNS-Fragmentierung (Endonukleolyse). Die Zytoplasmamembran bleibt charakteristischerweise erhalten, sodaß wenig der intrazellulären Bestandteile zu inflammatorischen Reaktionen führen. Teile der Zytoplasmamembran können abgeschnürt (apoptotische Körperchen ähnlich wie Membranbläschen) und von Nachbarzellen über Phagolysosome aufgenommen werden. Die Asymmetrie der Zytoplasmamembran wird in apoptotischen Zellen aufgehoben. Die Bindung von Annexin V an das normalerweise nicht in der äußeren Lipidschicht vorhandene Phosphatidylserin kann eine solche Asymmetrie anzeigen. Onkose und Apoptose stellen extreme Pole eines zellulären Sterbekontinuums dar, das heißt, daß eine exakte Differenzierung nicht immer möglich ist. Zu den frühen Charakteristika der Apoptose zählt ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und ein Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoffderivate [539]. Es kann sich dann ein sehr großer mitochondrialer Kanalkomplex, die sogenannte Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP), öffnen und entläßt u.a. das APAF-1 (apoptosis protease-activating factor 1) bindende Cytochrom C [291]. Möglicherweise wird über das Apoptosom [291] die Aktivierung der Caspasen induziert, die weitere Proteasen und DNAsen aktivieren, die dann wiederum die typische DNS Fragmentierung und Chromatinverdichtung bedingen. Eine Reihe von Proteinen kann Apoptose in bestimmten Fällen über eine mitochondriale Wirkung regulieren. Hierzu zählen z.B. die Antagonisten Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w und auch Agonisten wie Bax, Bak, Bcl-X<sub>S</sub>, und Bad. Eine fast

unüberschaubare Anzahl apoptose-induzierender Faktoren sind für Endothelzellen beschrieben, zu denen klassischerweise auch der Entzug von Wachstumsfaktoren gehört [14].

Die Exposition von reaktiven Sauerstoffderivaten führt in einigen Endothelzellen zu Apoptose (Tabelle 3) und mit der Demonstration zahlreicher Antioxidantien als antiapoptotisch wirksame Substanzen wird oft der Einfluß reaktiver Sauerstoffderivate im Prozeß der Apoptose untermauert [268].

Tabelle 3: Exogene reaktive Sauerstoffderivate können endotheliale Apoptose induzieren

Zelltyp	Stimulus	Dauer	Apoptose	Onkose	Literatur
HUVEC	HX(100) / XO(10)	18 h	2,6 %	0 %	[110]
HUVEC	HX(30) / XO(20)	6 h	0 %	49 %	[301]
HUVEC	400 µM tBH	16 h	1,4 %	44 %	[487]
HUVEC	100 µM tBH	16 h	0,7 %	-0,2 %	[487]
HUVEC	500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	24 h	4,2 %	n.u.	[453]
HUVEC	200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	18 h	6,2 %	0 %	[201]
BAEC*	100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4 h	36 %	-3 %	[283]

HX = Hypoxanthin (µM); XO = Xanthinoxidase (mU/ml); tBH = tert-Butyl-Hydroperoxid; \*Zellen wurden in Suspension gemessen; n.u. = nicht untersucht

Zellen, die ihren normalen Kontakt mit der extrazellulären Matrix verlieren, zeigen eine Form der Apoptose, die als Anoikis bezeichnet wird. Dieser Prozess kann in Endothelzellen durch endogene Produktion reaktiver Sauerstoffderivate aktiviert werden [289] und erklärt möglicherweise den relativ hohen Anteil apoptotischer Zellen, die in Suspension gefunden wurden [283]. Die überwiegende Anzahl der Untersuchungen zeigt einen sehr geringen apoptotischen Anteil der insgesamt behandelten Zellen an. Bei toxischen Dosen reaktiver Sauerstoffderivate überwiegt das Auftreten der Onkose. Interessanterweise scheinen Zellen, die mit toxischen Dosen von reaktivem Sauerstoff behandelt wurden apoptotische Charakteristika anzunehmen wenn ihr Energieverlust aufgehalten wird. So kann der Anteil apoptotischer Endothelzellen über die Inhibition der Popy-ADP-

Ribosyl-Synthetase (PARP) [502] oder über den Zusatz von Glutamin deutlich zunehmen [283]. In der letztgenannten Untersuchung waren 25% der basal vorhandenen ATP-Konzentration nötig, um den Prozess der Apoptose aufrecht erhalten zu können.

Der Einfluß von NO<sup>•</sup>-Donatoren auf endotheliale Apoptose ist uneinheitlich. Direkte NO<sup>•</sup> vermittelte Apoptose sind nach hohen Donatordosen in humanen [426], bovinen [328], murinen [483] und Rattenendothelien [452] beschrieben. Auch wurden sekundäre NO<sup>•</sup>-vermittelte Apoptoseinduktionen nach Exposition mit 2-Methoxy-Östradiol in BCAEC [479], nach Stimulation mit natriuretischen Peptiden in mikrovaskulären Rattenendothelzellen [452] und auch nach Stimulation mit Angiotensin II in HUVEC [111] beschrieben. Entgegen dieser proapoptotischen Funktion können NO<sup>•</sup> Donatoren in weitaus geringeren Dosen apoptotische Prozesse in SPAEC [73], in PAEC [104], in RAEC [455], und auch in HUVEC [107] inhibieren. Die antiapoptotische Wirkung konnte in HUVEC über eine NP-induzierte Cystein-Nitrosylierung der Protease Caspase-3 erklärt werden [109, 405]. Für diese insgesamt widersprüchlichen Angaben gibt es bisher keine schlüssige Erklärung.

#### IV.2.2. Endotheliale Apoptose durch proinflammatorische Mediatoren

Zu den gut bekannten Mediatoren im Rahmen einer Sepsis zählen Induktoren der Apoptose zählen LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1, die ebenfalls als klassische Induktoren der Apoptose fungieren. TNF- $\alpha$  bindet Endothelzellen über p55 Rezeptortrimere und induziert divergente Signale: zum einen ein proapoptotisches Signal und gleichzeitig ein NF- $\kappa$ B abhängiges antiapoptotisches Signal [88, 142]. IL-1 wirkt hauptsächlich über den zur Toll-Rezeptorfamilie gehörigen IL-1-Rezeptor Typ 1 und aktiviert eine Phosphorylierungskaskade zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Die bekannten Signale für LPS in Endothelzellen benötigen zunächst zirkulierendes CD14 und wahrscheinlich auch Toll-ähnliche Rezeptoren, die die gleiche Phosphorylierungskaskade einschließen [541, 543]. Untersuchungen zur endothelialen Apoptose wurden vorwiegend zu TNF- $\alpha$  (Tabelle 4) und LPS (Tabelle 5) durchgeführt.

Tabelle 4: TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose in unterschiedlichen Endothelzellen.

Typ	Dosis	Dauer	Apoptoseanstieg	Literatur
HUVEC	300 U/ml	18 h	ca. 6 %	[109]
HUVEC	400 U/ml	18 h	ca. 2 %	[110]
HUVEC	300 U/ml	18 h	4,2 %	[201]
HUVEC	400 U/ml *	24 h	0-2 %	[3]
HUVEC	4000 U/ml *	24 h	0 %	[541]
HUVEC	800 U/ml *	18 h	0 %	[377]
HUVEC	1000 U/ml *	24 h	0 %	[504]
HUVEC	1000 U/ml	20 h	0 %	[525]
HUVEC	500 U/ml	6 h	0 %	[449]
HUVEC	50 U/ml	6 h	0 %	[437]
HUVEC	100 U/ml	24 h	0 %	[434]
HUVEC	3600 U/ml *	24 h	33 %	[443]
HSMEC	500 U/ml	6 h	0 %	[449]
HCAEC	4000 U/ml *	24 h	22 %	[290]
HCAEC	4000 U/ml *	24 h	12 %	[207]
BAEC	200 U/ml	12 h	0 %	[27]
PAEC	4000 U/ml *	6 h	0 %	[437]
RBEC	200 U/ml *	48 h	2,6 %	[166]
BGEC	1000 U/ml *	24 h	25 %	[319]
MBMEC	100 U/ml *	72 h	35 %	[302]

\* Werte wurden aus ng/ml in U/ml gemäß WHO Standard umgerechnet.

Tabelle 5: LPS induzierte Apoptose in Endothelzellen

Typ	Dosis	Dauer	Apoptoseanstieg	Literatur
HUVEC	1 µg/ml	24 h	0 %	[541]
HUVEC	0,1 µg/ml	24 h	0 %	[504]
HMEC-1	0,1 µg/ml	15 h	0 %	[218]
HUVEC	1 µg/ml	18 h	ca. 2 %	[191]
MLEC	10 µg/ml	4 h	vorhanden	[214]
PAEC	2,5 µg/ml	8 h	0 %	[60]
BAEC	0,1 µg/ml	24 h	25 %	[115]
BGEC	0,03 µg/ml	24 h	45 %	[319]
SPAEC	0,1 µg/ml	4 h	22 %	[73]
SPAEC	0,1 µg/ml	4 h	vorhanden	[481]
SPAEC	0,1 µg/ml	4 h	vorhanden	[215]
BAVEC	1 µg/ml	24 h	0 %	[298]

Generell haben sowohl LPS, als auch IL-1 und TNF- $\alpha$  nur wenig direkte toxische Effekte auf die meisten der untersuchten Endothelzellen. Konsistente Ausnahmen bilden hiervon lediglich Rinder- und Schafendothelien [376]. Wahrscheinlich wird bei diesen Mediatoren in der überwiegenden Zahl der Fälle ein NF- $\kappa$ B abhängiges Signal induziert, das die Produktion von Caspaseinhibitoren wie z.B. bcl 2 anregt und somit die Apoptose aufhalten kann.

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, das IFN- $\gamma$ , scheint insgesamt etwas potenter als Apoptoseinduktor in frisch isolierten Endothelzellen zu wirken (Tabelle 6).

Tabelle 6: Apoptoseinduktion in Endothelzellen durch IFN- $\gamma$ 

Typ	Dosis	Dauer	Apoptoseanstieg	Literatur
HUVEC	10 U/ml	8 h	42 %	[306]
HUVEC	2 ng/ml	24 h	24 %	[504]
HDMEC	1000 U/ml	48 h	20 %	[422]
HUVEC	1000 U/ml	48 h	vorh.	[361]
HDMEC	1000 U/ml	48 h	vorh.	[361]

Allerdings kann auch hier eine beträchtliche Zelltypenabhängigkeit festgestellt werden. Während IFN- $\gamma$  und auch Kombinationen mit TNF- $\alpha$  und IL-1 in frisch isolierten humanen Saphenaendothelzellen nicht zu einer toxischen Reaktion führen, findet man zu etwa 9 % der mit IFN- $\gamma$  (1000 U/ml), TNF- $\alpha$  (10ng/ml) und IL-1 (5ng/ml) behandelten ECV 306 Zellen nach 48 h tote Zellen (Die Exposition mit den jeweils einzelnen Komponenten führte nicht zu toxischen Effekten). Eine DNS-Schädigung ist nach dieser Zeit in weitaus höherem Maße nachweisbar (Abb. 12).

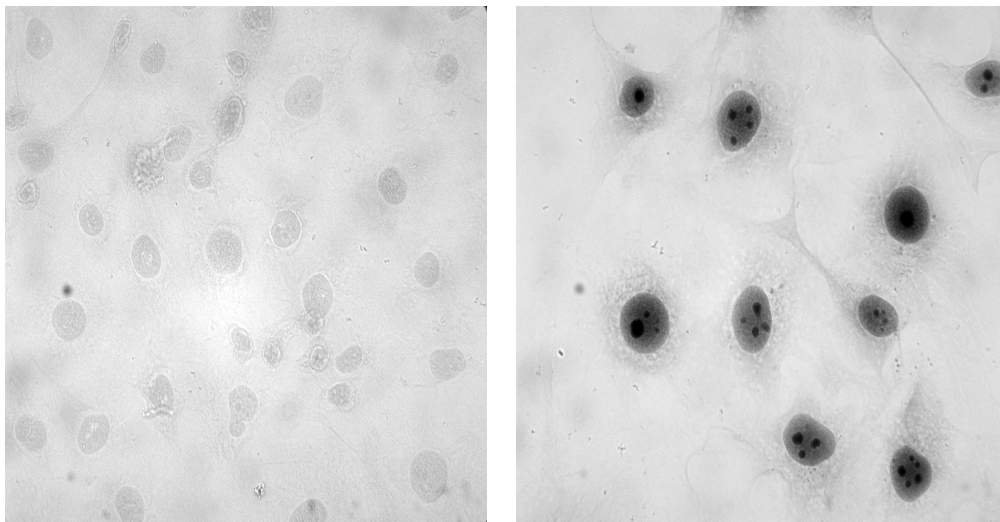


Abb 12: TUNEL-Färbung von ECV 306 Zellen nach proinflammatorischer Stimulation.

Links: 3 % der Kontrollkulturen zeigen eine nukleäre Schwärzung als Ausdruck einer Nukleotid-Polymerisierung nach DNS-Fragmentbildung.

Rechts: 45 % der Zellen, die mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) und IL-1 (5ng/ml) über 48 h behandelt wurden, weisen eine deutliche Schwärzung auf.

Die Schwärzung wurde nach Inkubation mit terminaler Desoxyribonukleotidyltransferase in Anwesenheit von Digoxigenin-desoxyuridintriphosphat und nachfolgender Inkubation mit anti-Digoxigeninantikörpern und sekundärem peroxidasegekoppeltem Antikörper mit DAB als Substrat gefärbt.

Darüber hinaus zeigen so vorbehandelte ECV-zellen erhöhte zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, eine vermehrte Histon-Bindung der DNS (Abb. 13) und auch einen Abfall des Membranpotentials  $\Delta\psi$  (Abb. 14). Eine Schädigung nach dieser Behandlung wird also deutlich, eine Apoptoseinduktion wahrscheinlich.



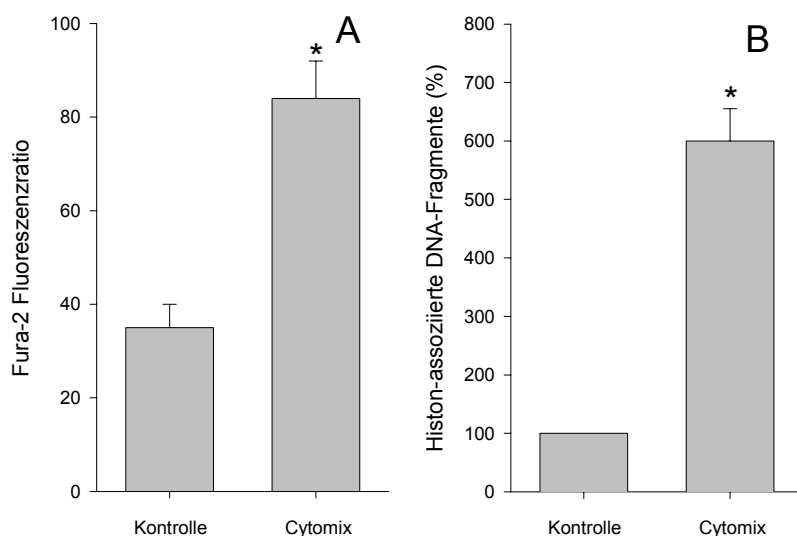


Abb. 13: Proinflammatorisch stimulierte Endothelzellen haben erhöhte zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte und zeigen vermehrt DNS-Fragmente.

In (A) wurden zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte in Endothelzellen unstimuliert (Kontrolle) und nach Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$  (10ng/ml),  $\text{IFN-}\gamma$  (1000 U/ml) und IL-1 (5ng/ml) (=Cytomix) über 48 h gemessen. In (B) sind Enzymimmunoassay-Werte von histongebundenen DNS-Fragmenten analog behandelter Zellen angegeben. Dargestellt sind jeweils Mittelwert  $\pm$  S.E.M. aus drei unabhängigen Versuchen.

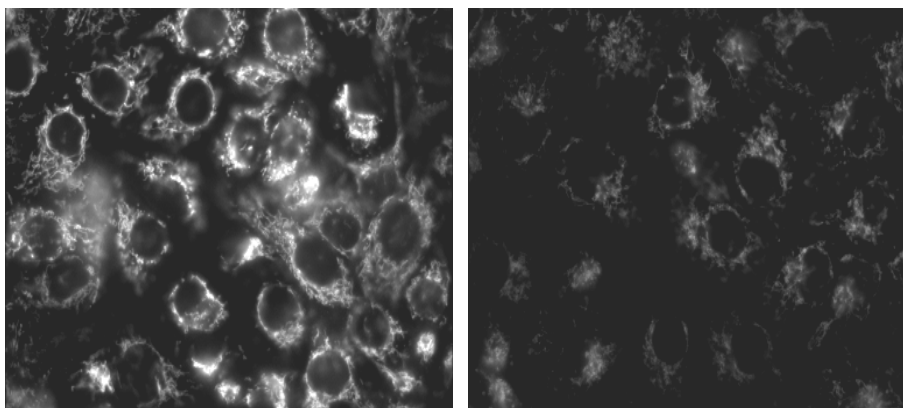


Abb. 14: Membranpotentialänderung in Endothelzellen nach dem Einfluß von Interferon- $\gamma$ , IL-1 und  $\text{TNF-}\alpha$ .

Das mitochondriale Membranpotential wurde semiquantitativ über eine Fluoreszenzintensitätsänderung von Rhodamin 1,2,3 erfasst. Links: Kontrollkultur nach 24 h. Rechts: Fluoreszenzaufnahme nach Exposition mit  $\text{TNF-}\alpha$  (10ng/ml),  $\text{IFN-}\gamma$  (1000 U/ml) und IL-1 (5ng/ml).

#### **IV.2.3. Endotheliale Apoptose in der Sepsis ?**

Die theoretischen Überlegungen einer endothelialen Apoptose fußen im wesentlichen auf den vorgenannten Untersuchungen in vitro und auch auf tierexperimentellen Daten. So konnte eine massive endotheliale Apoptose in Mäusen nach LPS-Applikation i.p. aufgezeigt werden [192]. Nutzt man dagegen ein CLP-Modell finden sich lediglich in der Lunge Zeichen für endotheliale Apoptose [209]. Die bisher wenigen Daten, die postmortal bei septischen Patienten haben erhoben werden können, zeigen auffälligerweise apoptotische Veränderungen in einigen Parenchymzellen, vor allem des lymphatischen Systems, nicht aber in Endothelzellen [210]. Daher bleibt die Annahme einer endothelialen Apoptose relevanten Ausmaßes bei septischen Patienten spekulativ [448].

### **IV.3. Signaleigenschaften reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies in Endothelzellen**

#### **IV.3.1. Extrazelluläre Stimulation mit reaktiven Sauerstoffderivaten**

Die exogene Stimulation mit reaktiven Sauerstoffderivaten in niedrigen Dosierungen führt nicht notwendigerweise zu toxischen Veränderungen. Sowohl reversible ATP-Abfälle, als auch reversible morphologische Veränderungen sind in Endothelzellen möglich [484]. Daneben ist eine Fülle von Zielstrukturen für andere regulatorische Wirkungen in Endothelzellen bekannt, die als Signalprozess mit der Aktivierung unterschiedlicher second-messenger Systeme verbunden sind.

Zu den wichtigsten second-messenger Systemen zählt die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die in sehr engen Grenzen reguliert wird. ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen sorgen für Gradienten gegenüber dem endoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien und auch dem Extrazellulärraum. Zahlreiche rezeptorvermittelte Stimulatoren führen G-Protein-abhängig zur Aktivierung einer Phospholipase C, die wiederum Diazylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) freisetzt.  $\text{IP}_3$  ist ein wesentlicher Mediator für die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern (vorwiegend dem ER). Ein Abfall der endoplasmatischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  führt zu einem Öffnen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Zytoplasmamembran. Wie dieser Mechanismus aktiviert wird ist noch immer unklar [388]. Neben dieser hochselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalfamilie existieren in Endothelzellen u.a. auch unselektive  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und andere Ionenkanäle, die in ihrer Summe den letztlich vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom determinieren [343].

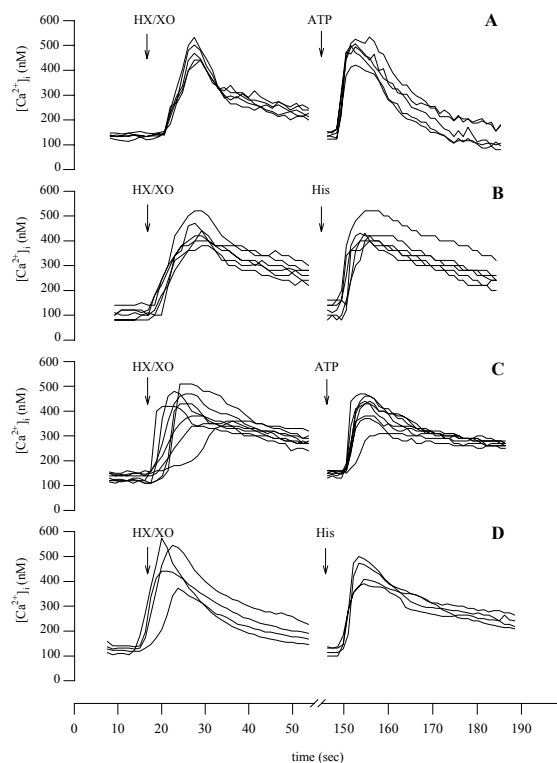


Abb. 15: Reaktive Sauerstoffderivate induzieren  $Ca^{2+}$ -Signale in Einzelzellen.

LEC (A,B) wurden mit XO (2 mU/ml) in Anwesenheit von HX (1mM) stimuliert. Nach einem Waschschrift erfolgte eine erneute Stimulation der selben Zellen mit ATP (10  $\mu$ M, A) oder Histamin (100  $\mu$ M, B). ECV (C,D) wurden ebenfalls mit HX/XO und nach einem Waschschrift mit ATP (10  $\mu$ M, A) oder Histamin (100  $\mu$ M, B) stimuliert. Angegeben sind jeweils Verläufe der  $[Ca^{2+}]_i$  in Einzelzellen.

Niedrig dosierte enzymatische  $O_2^{\cdot -}$  produzierende Systeme können reversible  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen innerhalb von Sekunden in Endothelzellen induzieren (Abb. 15). Es kommt zu einem transienten Anstieg der vorwiegend zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration, der in charakteristischer Weise denjenigen bekannter, rezeptorvermittelter Wirkungen von ATP oder Histamin entspricht. Rezeptorliganden-vermittelte  $Ca^{2+}$ -Signale können nach Vorinkubation mit toxischen Konzentrationen von *ter*-Butylhydroperoxid (t-buOOH) oder auch  $H_2O_2$  reduziert sein [513, 126]. Entgegen dieser Beschreibungen beeinträchtigt eine Stimulation mit niedrig dosiertem HX/XO allerdings nicht eine nachfolgende Stimulation mit ATP oder Histamin (Abb. 15). In Schweine- und Rinderaortenendothelien können induzierte  $Ca^{2+}$ -Signale sogar verstärkt werden, wenn mit niedrig dosierten Superoxiddonatoren prästimuliert wird [178, 247]. Es gibt also eine  $Ca^{2+}$ -signalgebende Wirkung reaktiver Sauerstoffderivate, die sich klar von oxidativem Stress im Sinne einer Zellschädigung trennen lässt. Die das  $Ca^{2+}$ -Signal initiiierende Spezies wurde in unseren Untersuchungen über folgende Ansätzen auf  $H_2O_2$

eingrenzt: (i) das  $O_2^{\cdot -}$  generierende System HX/XO führt in Anwesenheit von Katalase nicht mehr zu einem  $Ca^{2+}$ -Signal, wohingegen SOD das HX/XO induzierte Signal nicht aufhebt, (ii) das  $H_2O_2$  produzierende System G/GO führt katalase-sensitiv ebenfalls zu einem  $Ca^{2+}$ -Signal und (iii) die Anwesenheit von intrazellulären Fe-Chelatoren hat keinen Einfluss auf ein durch HX/XO oder G/GO induziertes  $Ca^{2+}$ -Signal [495] (Abb. 16). Solche differentiellen Effekte stehen im Gegensatz zu Untersuchungen in HUVEC, bei denen etwa fünffach höhere “Superoxidmengen” benutzt wurden, die wahrscheinlich toxisch sind [117].  $Ca^{2+}$ -Reaktionen waren in diesen Ansätzen O-phenanthrolin- (ein Eisen-Chelator) und SOD-sensitiv, d.h. die Bildung von  $OH^{\cdot}$  kann bei höheren Konzentrationen eine Rolle spielen [117, 24].

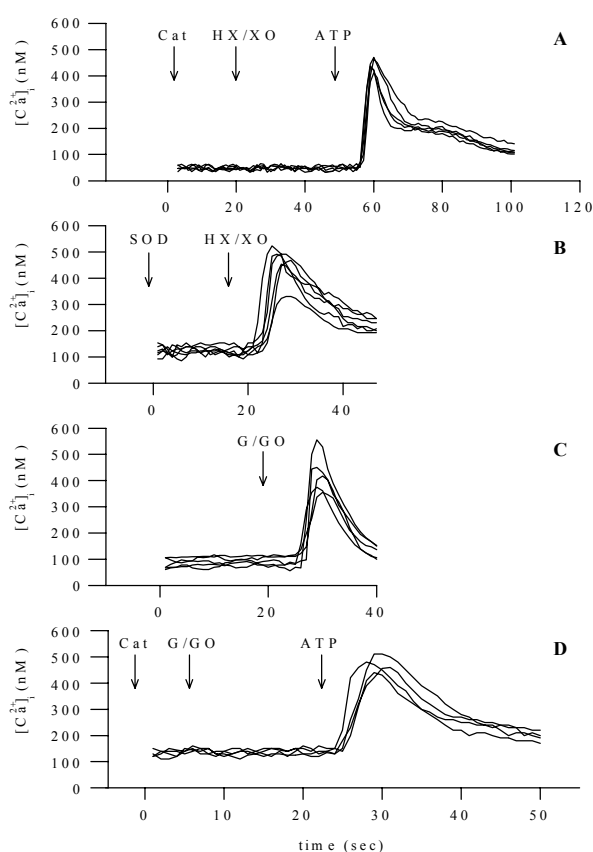


Abb. 16: Die durch reaktive Sauerstoffderivate induzierten  $Ca^{2+}$ -Signale in Endothelzellen sind von  $H_2O_2$  getragen.

In (A) wurden ECV in Anwesenheit von Katalase (50 U/ml) mit HX/XO (2mU/ml) und nachfolgend mit ATP (10  $\mu$ M) stimuliert. In (B) erfolgte die Stimulation mit HX/XO (2mU/ml) nach Vorinkubation mit SOD (50 U/ml). In (C) wurde das primär  $H_2O_2$  produzierende System G/GO (2 mU/ml) benutzt und in (D) erfolgte die Stimulation mit G/GO in Anwesenheit von Katalase (50 U/ml), sowie nachfolgend mit ATP (10  $\mu$ M).

Da die transienten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege nach Stimulation mit G/GO auch nachweisbar sind, wenn extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Ionen abgepuffert werden, kann man von einer primären Entleerung intrazellulärer Speicher ausgehen. Blockiert man die Wiederaufnahme von zytoplasmatischem  $Ca^{2+}$  in das endoplasmatische Retikulum mit Thapsigargin, so entleeren sich zunächst langsam diese  $Ca^{2+}$ -Speicher [161]. Nach der Entleerung dieser Thapsigargin-sensitiven Speicher lassen sich durch G/GO keine  $Ca^{2+}$ -Transienten mehr induzieren (Abb. 17). Der primäre Angriffspunkt der  $H_2O_2$  induzierten  $Ca^{2+}$ -Signalkaskade scheint proximal einer Phospholipase C lokalisiert, da es durch U73122 hemmbar ist [435]. Nachfolgende Arbeiten zeigen in menschlichen aortalen Endothelzellen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen nach Stimulation mit 100  $\mu M$   $H_2O_2$  [217]. Mittlerweile ist auch bekannt, daß zahlreiche Ionenkanäle in Endothelzellen durch  $H_2O_2$  direkt geregelt werden können [62].

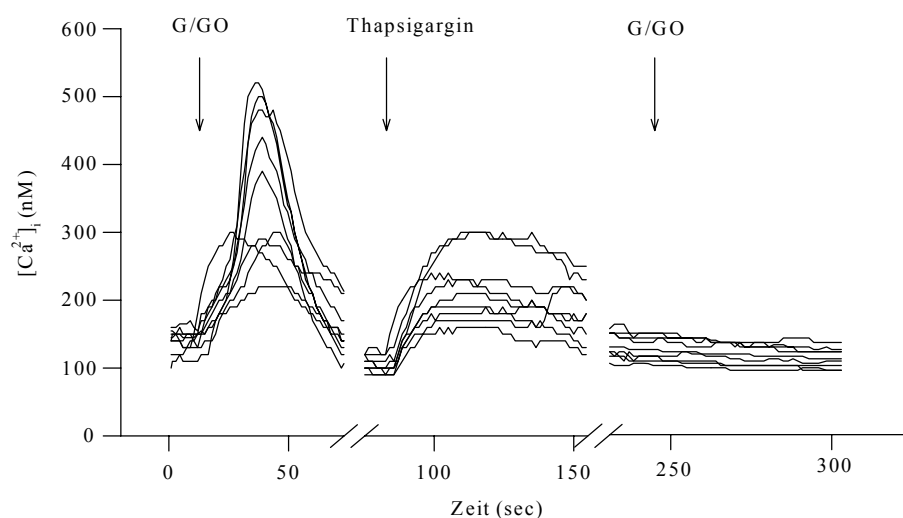


Abb. 17:  $H_2O_2$  entleert Thapsigargin-sensitive intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Speicher.

Das primär  $H_2O_2$  produzierende System G/GO (2 mU/ml) kein  $Ca^{2+}$ -Signal in Endothelzellen nach Vorbehandlung mit Thapsigargin (1  $\mu M$ ). Die jeweilige Zugabe ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die exakten Ziele der durch reaktive Sauerstoffderivate induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Endothelzellen bleiben allerdings unklar und wahrscheinlich nicht auf Membrannähe begrenzt, denn  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^{\cdot -}$  können Lipidmembranen durchdringen [172, 24, 304]. Regulatorische Wirkungen reaktiver Sauerstoffderivate an Proteinen können prinzipiell über direkte Oxidationen von Thiolgruppen erfolgen, oder aber indirekt über gemischte Disulfidbildung mit z.B. oxidiertem Glutathion (GSSG) [92, 144, 18, 252]. Thioredoxin scheint an der Reversibilität solcher Gleichgewichtsreaktionen an Proteinen beteiligt zu sein [421]. t-buOOH führt zu einem Anstieg des zytoplasmatischen Gehalts an oxidiertem Glutathion (GSSG) und kann damit einen unselektiven Kationenkanal in pulmonalarteriellen Kälberendothelzellen [256] oder einen den Trp-Proteinen homologen Kanal in Schweineaortenendothelzellen [30] aktivieren.

Die mit diesem sehr schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in Verbindung stehenden funktionellen Änderungen können vielfach beschriebene Reaktionen erklären. Hierzu zählen beispielsweise das Auflösen der filamentären Struktur von Vimentin und Tubulin [484], die Sekretion des in Weibel-Palade-Körperchen gespeicherten von-Willebrandt-Faktors [492] oder die Freisetzung von t-PA [423].

Zahlreiche Studien zeigen einen wachstumsfaktortypischen Aktivierungsprozess in Endothelzellen nach Exposition mit subtoxischen Konzentrationen von reaktivem Sauerstoff, ohne daß dies auch einen Proliferationsreiz darstellen muß. Protein-Phosphorylierungskaskaden (=Kinasenaktivität) scheinen in der Summe gegenüber Dephosphorylierungsreaktionen (=Phosphatasenaktivität) zu überwiegen [240]. Tyrosin-Phosphatasen haben alle reaktive Cystein-Reste in den katalytischen Zentren, die über eine Oxidation inhibiert werden, sodaß Tyrosin-phosphorylierungen überwiegen können [145]. Arterielle Rinderendothelzellen zeigen erhöhte Phospholipasenaktivität nach Stimulation mit  $100\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{O}_2$ , die vermutlich von einer Proteinkinase C und Tyrosinkinaseaktivität abhängt [340, 54].  $100\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{O}_2$  aktiviert in Schweineaortenendothelzellen und BPAEC Phosphorylierungsreaktionen (Tyrosin- und auch Serin-/Threonin-Kinasen) [34, 71]. Die gleiche Dosis aktiviert in Schweineaortenendothelzellen die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa\text{B}$  und AP-1 [34], nicht aber in HUVEC [53].

Mittlerweile verdichten sich ebenfalls Hinweise darauf, daß der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B kein direktes Ziel für reaktive Sauerstoffderivate darstellt, sondern vielmehr Phosphorylierungsreaktionen an I $\kappa$ B, das unter Ruhebedingungen die nukleäre Translokation verhindert [493, 70]. Die noch unklaren Ziele für Endothelzellen konzentrieren sich auf die kleinen GTP-bindenden Proteine ras und rac1 als auf die große Familie der mitogen-activated-protein (MAP)- Kinasen [378, 42]. Ebenfalls scheint die Lipidperoxidation ein wichtiger Zwischenschritt bei der Aktivierung zu sein [53, 56].

BAEC zeigen angiogenetische Eigenschaften nach Stimulation mit nur 1  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [533]. Aus Endothelzellen des Rattenherzens kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> den Wachstumsfaktor VEGF [83] und aus humanen venösen Endothelzellen M-CSF freisetzen [205]. Dennoch kann das Wachstum von BAEC durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gehemmt [394] oder stimuliert sein [412].

Oft wird eine endotheliale Aktivierung über ein verändertes Expressionsverhalten von Adhäsionsmolekülen beschrieben. Die Expression von ICAM-1 kann im Gegensatz zu VCAM-1, E-Selectin und P-Selektin auf unterschiedlichen Endothelzelltypen nach exogener Stimulation mit reaktiven Sauerstoffderivaten regelhaft erhöht gemessen werden [274, 273]. Die meisten der beschriebenen Aktivierungsmerkmale benötigen eine Neosynthese, die von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren abhängt. Die in diesem Zusammenhang am besten untersuchten Faktoren sind NF- $\kappa$ B und AP-1. In der Tabelle 7 sind einige Ergebnisse nach direkter Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in unterschiedlichen Endothelzellen aufgezeigt. Grundsätzlich kann also nicht davon ausgegangen, daß ein aktiviertes NF- $\kappa$ B vorliegt, obwohl NF- $\kappa$ B abhängige Gene wie z.B. IL-8 oder MCP-1 nach exogener Stimulation mit reaktiven Sauerstoffderivaten von Endothelzellen produziert werden können.



Tabelle 7: Die redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 sind in Endothelzellen durch exogene Stimulation mit reaktivem Sauerstoff nicht grundsätzlich induzierbar

Zelltyp	Stimulation	NF- $\kappa$ B	AP-1	Antwort	Autor
HUVEC	200 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	n.unt.	-	[53]
HUVEC	100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.unt.	n.unt.	IL-8 -, ICAM-1 $\uparrow$	[273]
HUVEC	50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	n.unt.	HLA I $\uparrow$ , ICAM-1 $\uparrow$	[55]
HUVEC	500 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	n.unt.	-	[236]
HOEC	500 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	IL-8 $\uparrow$	[431]
ECV	200 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	n.unt.	-	[53]
Ea.hy 926	100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.unt.	n.unt.	IL-8 $\uparrow$ ,	[273]
HMEC-1	100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	IL-8 -	[274]
HMEC-1	100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	MCP-1 $\uparrow$ , ICAM-1 $\uparrow$	[400]
PAEC	100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	pp60src $\uparrow$	[34]
RHEC	500 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	VEGF $\uparrow$	[83]
HPAEC	100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.unt.	n.unt.	IL-8 -	[273]
BAEC	GO*	n.unt.	+	eNOS $\uparrow$	[300]

- = nicht nachweisbar; + = nachweisbar. GO\* = 1mU/ml Glukseoxidase + 10 mM Glukse; ICAM-1 = Intercellular Adhesionmolecule 1; HLA = Human Leukocyte Antigen; MCP-1 = Monocyte Chemoattractant Protein 1; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor.

### IV.3.2. Extrazelluläre Stimulation mit reaktiven Stickstoffderivaten

In Analogie zu den Stimulationen mit exogenen reaktiven Sauerstoffderivaten reagieren Endothelzellen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach Stimulation mit  $\text{NO}^{\cdot}$ -Donatoren. Sowohl Nitroprussid (NP) als auch *S*-Nitroso-*N*-acetylpenicillamin (SNAP) induzieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Einzelzellen ohne dabei eine nachfolgende Stimulation mit ATP zu beeinträchtigen (Abb. 18).

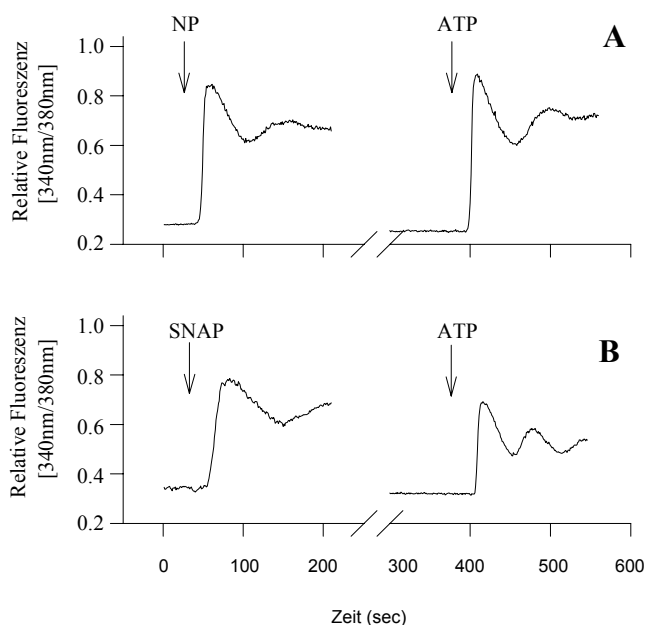


Abb. 18:  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Verläufe in Einzelzellen nach Stimulation  $\text{NO}^{\cdot}$  Donatoren.

In (A) wurden Endothelzellen mit Nitroprussid (100  $\mu\text{M}$ ) und in (B) mit SNAP (100  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Die selben Zellen wurden nach einem Waschschritt mit ATP (10  $\mu\text{M}$ ) stimuliert und zeigen unveränderte transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktionen im Vergleich zu nicht vorinkubierten, oder mit ATP vorinkubierten Zellen.

Oxyhämoglobin geht mit  $\text{NO}^{\cdot}$  eine nahezu irreversible sehr schnelle Bindung ein. Eine Koinkubation mit Oxyhämoglobin als Fänger für freiwerdendes  $\text{NO}^{\cdot}$  verhindert eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente in Endothelzellen nach Stimulation mit  $\text{NO}^{\cdot}$  Donatoren reversibel (Abb. 19).

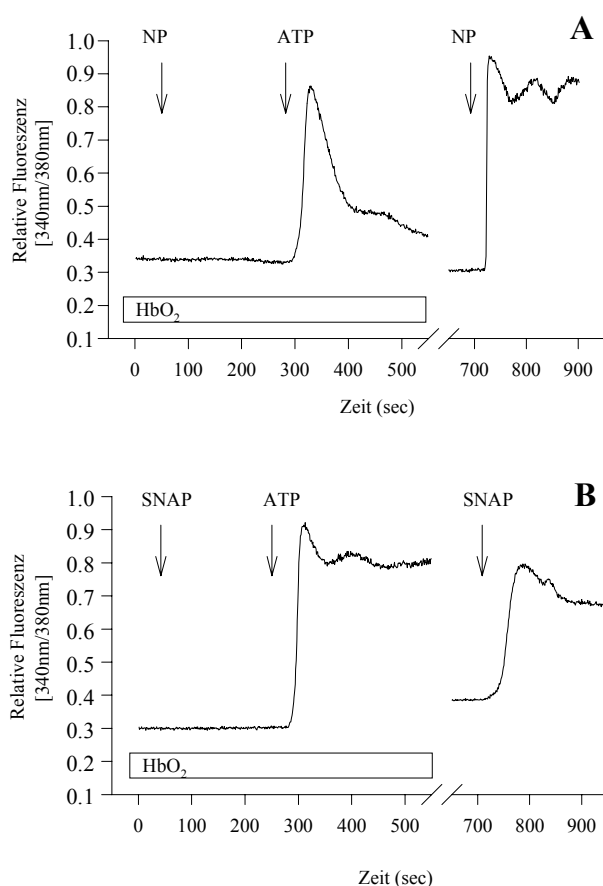


Abb. 19: NO<sup>•</sup> ist der Mediator für Ca<sup>2+</sup>-Signale in Einzelzellen nach Stimulation mit Nitroprussid und SNAP.

In (A) wurden Endothelzellen mit Nitroprussid (100μM) und in (B) mit SNAP (100μM) in Anwesenheit von Oxyhämoglobin (50μM) stimuliert. Oxyhämoglobin geht unter adäquaten Bedingungen in vitro eine sehr schnelle und feste Bindung mit NO<sup>•</sup> ein. Nach Auswaschen der Substanzen wurden die selben Zellen erneut mit Nitroprussid (100 μM) oder SNAP (100μM) stimuliert. Die Liberation von NO<sup>•</sup> aus Nitroprussid ist komplex und ist verbunden mit der Freisetzung von CN<sup>-</sup>. Kontrollstimulationen mit KCN (10mM) und Kaliumferrozyanid (10mM) führten nicht zu transienten Ca<sup>2+</sup>-Änderungen.

Direkte reversible NO<sup>•</sup> induzierte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstiege sind bisher in Beta-Zellen des Pankreas [516], in Hypophysenvorderlappenzellen [122], in einer Mäusemakrophagenzelllinie [258], in Caco-2BBE-Zellen [475], in Fibroblasten und Muskelzellen [451, 139], in interstitiellen Zellen des Kaninchenkolons [385] und auch kuerzlich in PAEC [43] beschrieben worden. NO<sup>•</sup> hat zahlreiche Einflüsse auf intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-regulierende Systeme. In Abb. 20 sind die bekannten Strukturen schematisch zusammengefaßt, die auch in Endothelzellen eine Rolle spielen können.

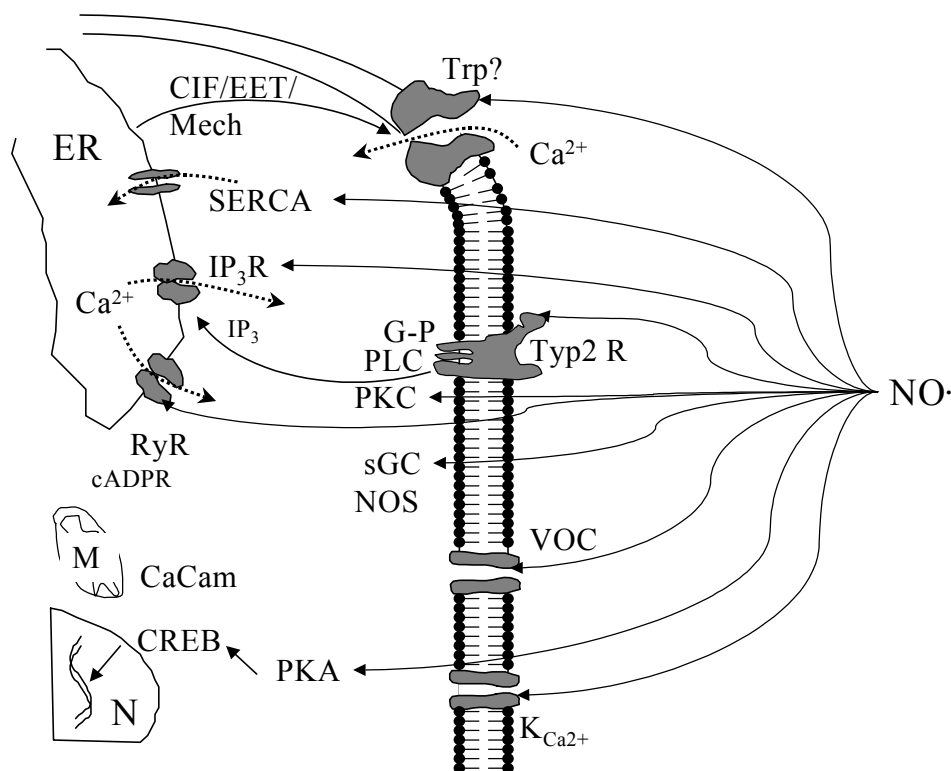


Abb. 20: Zielstrukturen, über die NO<sup>•</sup> die intrazelluläre [Ca<sup>2+</sup>] regeln kann.

Eine direkte S-Nitrosylierung von kritischen Cystein-Resten für die Regulation von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (VOC: [454] [68]), Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen [48, 186], Ryanodinrezeptoren (RyR : [528]), Ca<sup>2+</sup>-ATPasen des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA: [491] [472]) und G-Proteine [277] sind beschrieben. Second messenger Systeme, die abhängig von Phospholipasen, Proteinkinase C [175] oder Proteinkinase A [373] sind, können ebenfalls direkt durch NO<sup>•</sup> geregelt werden. Ebenso sind klassische, cGMP-abhängige, Phosphorylierungsreaktionen am IP<sub>3</sub>-Rezeptor [257] oder an der Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms [46] möglich.

Die Charakterisierung des durch NO<sup>•</sup> in Endothelzellen induzierten Ca<sup>2+</sup>-Signals zeigt, daß primär intrazelluläre Speicher entleert werden, da das Puffern mit EGTA im Extrazellulärraum das Ca<sup>2+</sup>-Signal in seiner initialen Phase nicht inhibiert. Ryanodinsensitive endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Speicher sind in unterschiedlichen Endothelzellen beschrieben worden [360]. Bisher kennt man drei strukturell ähnliche multimere Ryanodinrezeptortypen in Säugerzellen, die über cGMP-abhängige Kinasen und über Thiol-Nitrosylierungen in ihrer Aktivität reguliert werden können [135]. Diese Rezeptortypen können durch hohe Konzentrationen von Ryanodin (100µM; [320]), Dantrolen (100µM; [367]) und auch Caffein (20mM; [510])

gehemmt werden. Unter diesen Bedingungen waren nur minimale Reduktionen der durch NP induzierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den von uns untersuchten Endothelzellen erkennbar, eine primäre Entleerung Ryanodin-sensitiver Speicher scheint daher eher unwahrscheinlich. Die durch NP entleerbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher sind allerdings Cyclopiazonsäure- und Thapsigargin-sensitiv, das heißt, daß die Freisetzung eher aus dem endoplasmatischen Retikulum über  $\text{IP}_3$  abhängige Wege erfolgt. Da die meisten der bekannten  $\text{NO}^\bullet$ -Wirkungen über die Aktivierung der sehr sensitiven Guanylatzyklase ( $\text{IC}_{50}$  ca. 100 nM [518]) und nachfolgender cGMP Synthese und cGMP-abhängigen G-Kinasen erfolgt wurde weiterhin geprüft, ob cGMP von Bedeutung für die beschriebenen  $\text{NO}^\bullet$ -induzierten Signale ist. Inkubiert man Endothelzellen vor der Stimulation mit Hemmstoffen der löslichen Guanylatzyklase, wie z.B. Methylenblau oder LY83583, so findet man keine Inhibition der NP induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Auch die Zugabe eines membranpermeablen cGMP-Analogons, das 8-Br-cGMP induziert keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente [500].

Mit der Entleerung Thapsigargin- und Cyclopiazonsäure-sensitiver Speicher können auch in Endothelzellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran geöffnet werden [138], die allerdings in ihren elektrophysiologischen Charakteristika enorm differieren [343]. Ungeachtet dessen wird mit der durch NP induzierten Entleerung intrazellulärer Speicher auch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran induziert, der sich nicht durch den spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker Diltiazem hemmen läßt.

Auch hier kann also zusammenfassend festgehalten werden, daß die exogene Zugabe von  $\text{NO}^\bullet$ -Donatoren in Endothelzellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale induziert, die wie rezeptorvermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Verläufe aussehen. Die Menge des freigesetzten  $\text{NO}^\bullet$  entspricht unter den benutzten Bedingungen für NP und SNAP (100  $\mu\text{M}$ ) etwa 50-150 nM [228, 331, 427] und erreicht damit Konzentrationen, die von Endothelzellen in vitro nach einer Stimulation erreicht werden können [476].

Die exogene Zugabe von unterschiedlichen  $\text{NO}^\bullet$ -Donatoren führt in Endothelzellen in der überwiegenden Zahl der publizierten Untersuchungen zu einer

Inhibition NF- $\kappa$ B-abhängiger Prozesse [441, 440, 245, 540] kann allerdings in transformierten Mäuseherzendothelien eine NF- $\kappa$ B Aktivität verstärken [483]. Andererseits kann aber die Sekretion von Interleukin-8 durch NO $\cdot$  Donatoren in Endothelzellen [489] induziert werden. Unsere Untersuchungen über NO $\cdot$ -induzierte Ca $^{2+}$ -Signale in Endothelzellen legen also nahe, daß intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Änderungen an der Synthese von Interleukin-8 in Endothelzellen beteiligt sind. Hierzu wurden Endothelzellen über 24 h mit NP oder SNAP inkubiert und im Überstand vorhandenes IL-8 gemessen.

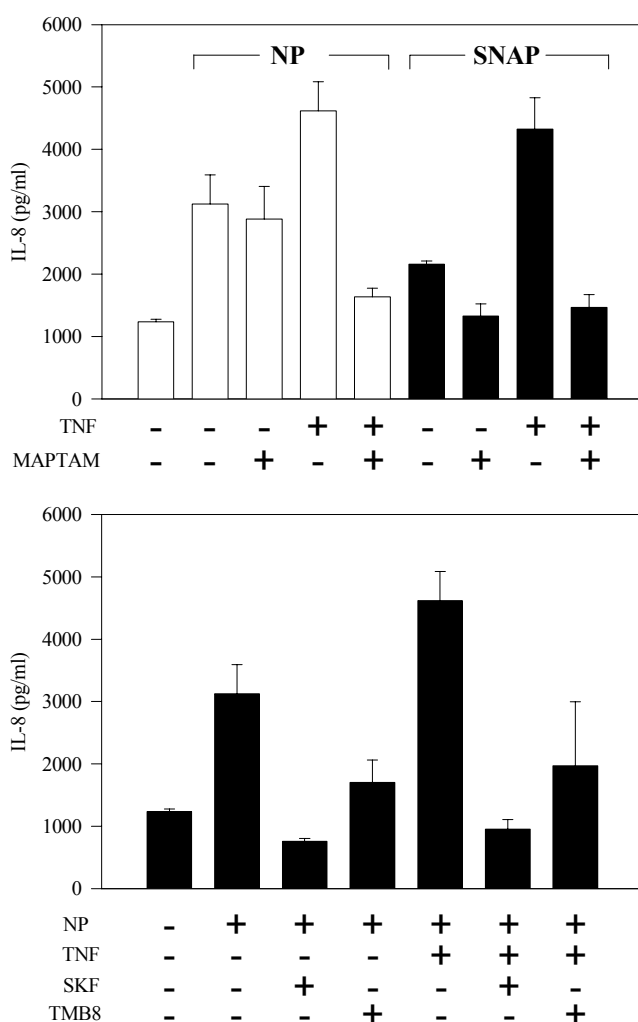


Abb. 21:

**A** Einfluß von TNF- $\alpha$  und NO $\cdot$ -Donatoren auf eine endotheliale IL-8-Produktion.

Die im Überstand nach 24 h vorhandene Menge IL-8 wurde über einen ELISA (Milenia®, DPC Biemann, Deutschland) bestimmt. In (A) wurden ECV 306 Zellen mit Nitroprussid (100  $\mu$ M), oder SNAP (100  $\mu$ M) in Gegenwart von TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und/oder einem intrazellulären Ca $^{2+}$ -Puffer (MAPT-AM, 15  $\mu$ M) wie angegeben inkubiert. In (B) wurde ECV 306 Zellen mit Nitroprussid (100  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) sowie den spannungsunabhängigen Ca $^{2+}$ -Antagonisten SKF 96365 (50  $\mu$ M) oder TMB-8 (100  $\mu$ M) wie angegeben inkubiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Ansätzen.

Interessanterweise läßt sich eine NP-induzierte IL-8 Synthese über die Koinkubation mit MAPT-AM, eines membrangängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffers, kaum, eine SNAP-induzierte IL-8 Synthese aber deutlich inhibieren (Abb. 21). Die kombinierte Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$  und beiden  $\text{NO}\cdot$ -Donatoren wird in Anwesenheit von MAPT-AM allerdings deutlich reduziert. SKF 96365 kann den kapazitativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Endothelzellen hemmen [177] und inhibiert sowohl die NP induzierte IL-8 Synthese als auch die IL-8 Synthese der kombinierten Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$  und NP (Abb. 21). Mit etwas geringerer Potenz reduziert TMB-8, das die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern hemmt [531], die IL-8 Synthese durch NP und auch die kombinierte NP und  $\text{TNF-}\alpha$  Stimulation. Es zeigt sich also, daß eine  $\text{NO}\cdot$ -induzierte IL-8 Synthese in Endothelzellen über  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen reguliert werden kann [496].

### IV.3.3. Reaktive Sauerstoffderivate als second messenger

Mit der Möglichkeit der Modulation von Proteinfunktionen durch reaktive Sauerstoffderivate liegt die Vermutung nahe, daß reaktiver Sauerstoff auch als second messenger von Zellen benutzt wird. Nachdem erstmals über resonanzspektroskopische Methoden eine  $O_2^{\cdot-}$  Produktion in Schweineaortenendothelzellen nachgewiesen wurde [403] sind in der Folge zahlreiche Untersuchungen publiziert worden, die eine solche These stützen. Endothelzellen, die auf ganz unterschiedliche Weise stimuliert werden, können mit einer vermehrten endogenen Produktion von reaktiven Sauerstoffderivaten reagieren. Hierzu zählen auch mechanische Bedingungen (zyklische Dehnung, Schubspannung), die über die Produktion von reaktivem Sauerstoff unterschiedliche Funktionen regeln (Tabelle 8).

Tabelle 8: Endogene Produktion reaktiver Sauerstoffderivate in Endothelzellen

Typ	Stimulus	Nachweis	Funktion	Literatur
PAEC	-	DMPO-EPR	-	[403]
BAEC	-	HRP/PHPA	-	[363]
BAEC	-	HVM-Dim.	-	[248]
RAEC/BAEC	-	CytC	-	[450]
BAEC	-	CytC	Proliferation	[15]
Zyklische Dehnung (Längenänderung, Frequenz)				
HAEC	10%, 0,9 Hz	CytC	eNOS ↑	[90]
HUVEC	12%, 1Hz	DCF	ICAM-1↑	[78]
HUVEC	12%, 1Hz	Lucig. CL	MCP-1↑	[523]
HUVEC	12%, 1Hz	DCF	PAI-1↑	[77]
PAEC	20%, 1Hz	TBARS, HRP/PHPA	NADH ox.	[212]
Schubspannung (dyn/cm <sup>2</sup> , Dauer)				
HUVEC	20, 12h	Lucig. CL	ICAM-1	[80]
HUVEC	5-40, 120 min	DCF	c-fos↑	[216]
HUVEC	+/- 5, 24 h	DHE	HO-1↑,SOD↑	[100]
BAEC	20, 30 min	oxProt	rac-1/MAPK	[534]

DMPO-EPR = Dimethylpyrrolinoxid- Elektron Paramagnetische Resonanzspektroskopie; HRP/PHPA = Meerrettichperoxidase vermittelte p-Hydroxyphenylacetosäureoxidation; HVM-Dim.= Homovanillinmandelsäredimerisierung; CytC = SOD inhibierbare Ferricytochrom C Reduktion; DCF = Dichlorodihydrofluoreszein-Fluoreszenz; Lucig. CL = Lucigenin verstärkte Chemilumineszenz; TBARS = Thiobarbitursäure reaktive Substanzen; DHE = Dihydroethidium-Fluoreszenz; oxProt= oxidierte Proteine; ET-1 = Endothelin 1; ICAM-1= Intercellular Adhesion Molecule 1; MCP-1= Monocyte Chemoattractant Protein 1; HO-1 = Hämoxygenase 1; MAPK = Mitogen aktivierte Proteinkinasen.



Ähnlich, wie die exogene niedrig dosierte Stimulation mit reaktiven Sauerstoffderivaten zu wachstumsfaktortypischen Signalen führt, so werden durch Wachstumsfaktoren in Endothelzellen reaktive Sauerstoffderivate produziert. Eine solche Produktion ist für TGF- $\beta$  in BAEC [468] und Angiotensin II in HUVEC [544] nachgewiesen. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß zahlreiche Wachstumsfaktoren in anderen als Endothelzellen über eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffderivate zu Tyrosin-Phosphorylierungen führen [414, 230, 144]. Interessanterweise konnte kürzlich auch in einem Migrationsmodell in aortalen Mäuseendothelzellen gezeigt werden, daß die Produktion reaktiver Sauerstoffderivate notwendig ist, um eine adäquate Aktinpolymerisierung zu gewährleisten [322].

#### IV.3.4. Endotheliale Signale reaktiver Sauerstoffderivate durch proinflammatorische Mediatoren

In Endothelzelllinien kann nach proinflammatorischer Stimulation über redoxaktive Fluoreszenzfarbstoffe ebenfalls eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffderivate gezeigt werden (Abb. 22). In Tabelle 9 ist eine Übersicht einiger Untersuchungen gegeben, die zu sehr unterschiedlichen und widersprüchlichen Ergebnissen führen. So scheint beispielsweise LPS nur hochdosiert über mindestens 24 h quantifizierbar einen oxidativen Stress zu induzieren, TNF- $\alpha$  eine hohe Zelltypenabhängigkeit zu besitzen und auch unabhängig von einer quantifizierbaren Erhöhung reaktiver Sauerstoffderivate zu einer endothelialen Aktivierung zu führen [12]. In aller Regel finden sich in publizierten Ergebnissen bei kombinierten Stimulationen die intensivsten Produktionsraten.

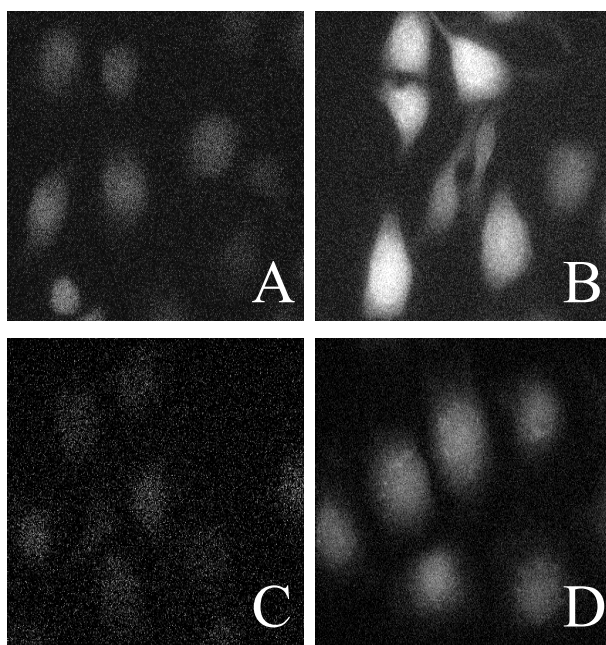


Abb. 22:  
Endogene Produktion reaktiver Sauerstoffderivate in Endothelzellen.

In (A) wurden ECV 306 Zellen unbehandelt, in (B) mit IL-1 (5 ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), in (C) zusätzlich mit dem Antioxidans Tiron (10 mM) und in (D) mit Tempol (1 mM) über 48 h inkubiert. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen repräsentativer Populationen nach Inkubation mit Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (20  $\mu$ M, 30 min). Eine Zunahme der Helligkeit korreliert dabei mit vermehrter Produktion reaktiver Sauerstoffderivate

Tabelle 9: Proinflammatorische Mediatoren können in Endothelzellen über die endogene Produktion reaktiver Sauerstoffderivate Funktionsänderungen regeln.

Zelltyp	Stimulus (Menge, Dauer)	Methode	Produktion	Funktion	Literatur
HUVEC	LPS (10µg/ml, 2h)	CytC	-		[310]
BAEC	LPS (1µg/ml, 12h)	Pterinox.	-		[407]
RDMEC	LPS (10µg/ml, 24h)	CytC	+		[333]
RLMEC	LPS (10µg/ml, 24h)	CytC	+		[333]
HUVEC,	TNF-α (100U/ml, 0,5h)	CytC	+	VCAM-1↑	[511]
HPAEC	TNF-α (100U/ml, 1h)	DCF	+	E-Selectin↑	[392]
HPAEC	TNF-α (100U/ml, 1h)	DCF	+	ICAM-1↑	[391]
ECV	TNF-α (400U/ml, 0,5h)	DCF	-	NF-κB↑	[53]
ECV	TNF-α (400U/ml, 48h)	DCF	-		[497]
EA.hy	TNF-α (300U/ml, 1h)	Lucig.	-		
		NBT	-		
		CytC	-		
		DCF	-	ICAM-1↑	[12]
RPAEC*	TNF-α (6nM, 1h)	CytC	+		[332]
PPAEC	TNF-α (100U/ml, 21h)	DCF	+	Apoptose	[470]
PPAEC	TNF-α (100U/ml, 21h)	DCF	+	Permeabilität ↑	[469]
PAEC	TNF-α (100U/ml, 1,5h)	HVA	+	E-Selectin↑	[141]
BAEC	TNF-α (1000U/ml, 12h)	Pterinox.	-		[407]
HUVEC	IL-1 (0,5U/ml, 2h)	CytC	+		[310]
HUVEC	IL-1 (0,5U/ml, 1h)	CytC, amp.	(+)**		[384]
ECV	IL-1 (5ng/ml, 48h)	DCF	-		[497]
ECV	IL-1 (10ng/ml, 0,5h)	DCF	-	NF-κB↑	[53]
HUVEC	IFN-γ (100U/ml, 2h)	CytC	+		[310]
RDMEC	IFN-γ (25U/ml, 24h)	CytC	+		[333]
RLMEC	IFN-γ (25U/ml, 24h)	CytC	+		[333]
ECV	IFN-γ (1000U/ml, 48h)	DCF	-		[497]
RDMEC	IFN-γ (25U/ml, 24h)				
	+ LPS (10µg/ml, 24h)	CytC	+		[333]
HAEC*	LPS (10 ng/ml)				
	+TNF-α (10U/ml, 4h)	Lucig.	+	VCAM-1↑	[474]
ECV	IFN-γ (100 U/ml)+ TNF-α (400U/ml) + IL-1 (5ng/ml)	DCF	+	IL-6, MCP-1↑	[497]
RLMEC	IFN-γ (25U/ml, 24h)				
	+LPS (19µg/ml, 24h)	CytC	-		[333]

- = negativer Produktionsnachweis; + = Nachweis einer Produktion. Pterinox. = Katalase sensitive Pteridinoxidation; CytC = SOD inhibierbare Ferricytochrom C Reduktion; Lucig. = Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz; HVA = Homovanillinsäureoxidation; DCF = Dichloro-, oder Dichlorodihydrofluoreszein-fluoreszenz; amp. = amperometrisch; VCAM-1 = Vascular Cell Adhesion Molecule 1; ICAM-1 = Intercellular Adhesion Molecule 1; MCP-1 = Monocyte Chemoattractant Protein 1; NF-κB = Nuclear Factor κ B. \* Zellen in Suspension. \*\* Transiente Produktion für ca. 1h.

Der am besten untersuchte Enzymkomplex zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ist der NADPH-Oxidase-Komplex phagozytierender Zellen [26]. Teile dieses Komplexes sind auch in Endothelzellen nachweisbar [235, 37, 25]. Die Aktivität dieses Komplexes wird u.a. über eine große Proteinfamilie kleiner GTPasen geregelt, von denen ras und rac-1 kritische Komponenten darstellen [230, 144, 534]. Als Quelle für die vermehrt gebildeten reaktiven Sauerstoffderivate nach Exposition mit IL-1, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in ECV Zellen ist eine NADH-Oxidase wahrscheinlich, da das Fluoreszenzsignal durch NADH verstärkt wird, nicht aber durch NADPH, oder Xanthin. Eine vermehrte Superoxidproduktion über NOS ist unwahrscheinlich, da auch die Mehrproduktion über L-NMA hemmbar sein müßte [330]. Der endotheliale NAD(P)H-Oxidase-Komplex enthält auch ein Flavoprotein, das über Diphenyliodonium hemmbar ist. Eine Koinkubation mit Diphenyliodonium inhibiert deutlich die DCF-Fluoreszenz (Abb. 23).

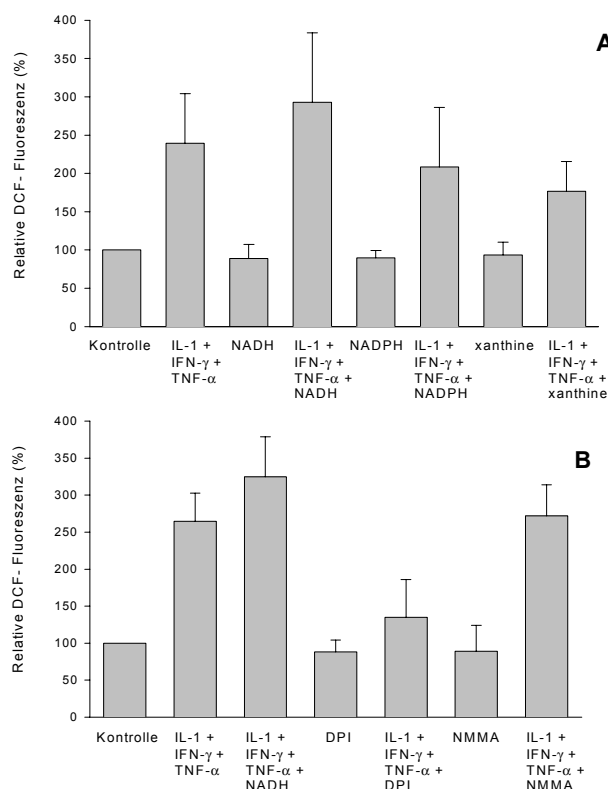


Abb. 23: Die Quelle der vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffderivate in ECV 306-Zellen kann ein NADH-Oxidase-Komplex sein.

In (A) wurden ECV 306-Zellen mit IL-1 (5 ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) über 48 h inkubiert und wie angegeben zusätzlich mit NADH (100  $\mu$ M), NADPH (100  $\mu$ M), oder Xanthin (100  $\mu$ M). In (B) wurde zusätzlich der Flavoproteinhemmer Diphenyliodonium (DPI 100 $\mu$ M), oder der unspezifische NOS-Inhibitor L-NMMA (100  $\mu$ M) inkubiert. Angegeben sind jeweils relative Fluoreszenzintensitätsänderungen ( $\pm$  SEM) im Vergleich zu Kontrollinkubationen.

Die benutzten Zellen produzieren nach der kombinierten proinflammatorischen Stimulation IL-6 und MCP-1. Beide Zytokine werden durch Tiron und Tempol in ihrer Synthese inhibiert, wobei Tiron potenter erscheint (Abb. 24). Auch L-NMMA hemmt, wenn auch weniger potent eine kombiniert stimulierte Zytokinsekretion. Diese Ergebnisse legen also nahe, daß eine endogene Produktion reaktiver Sauerstoffderivate in Endothelzellen zur Synthese von IL-6 und MCP-1 beiträgt, wobei der Einfluß einer Peroxynitritbildung unter den benutzten Bedingungen nicht ausgeschlossen ist, da auch L-NMMA hemmende Wirkung zeigt [497]. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß eine durch proinflammatorische Stimulation induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffderivate in Endothelzellen zelltyp-, und stimulationsabhängig nachweisbar ist. Die Bedeutung dieser Produktion für die Regelung von endothelialen Funktionen ist bisher nur in Ansätzen beschrieben. Ebenso erscheint es möglich, daß eine Ruheproduktionsrate ausreicht um beispielsweise die Aktivität von NF- $\kappa$ B, die Expression von Adhäsionsmolekülen, oder die Sekretion von Endothelin-1 zu regeln. Ob hierfür eine Interaktion mit NO $\cdot$  von Bedeutung ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

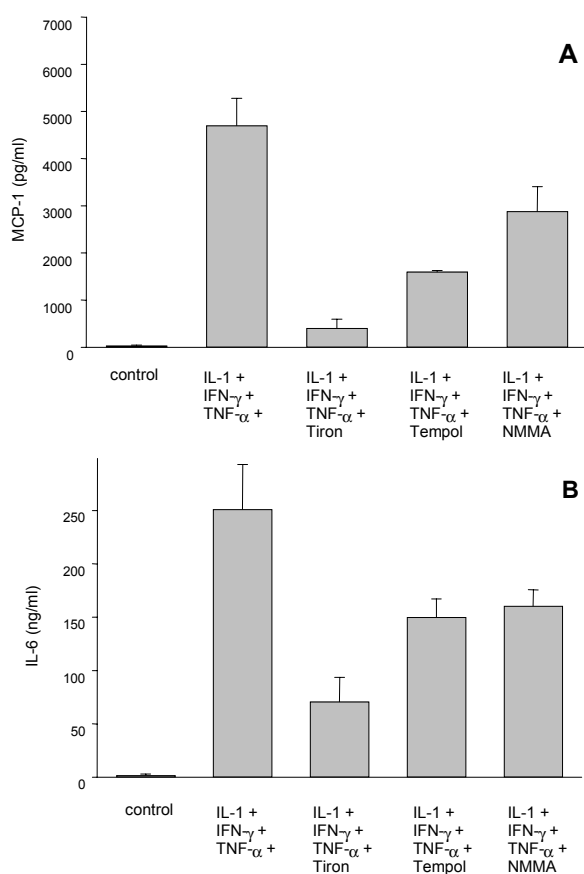


Abb. 24: Endotheliale Synthese von IL-6 und MCP-1 nach proinflammatorischer Stimulation.

In (A) wurde im Überstand vorhandenes MCP-1 und in (B) IL-6 nach proinflammatorischer Stimulation wie in Abb. 20 bestimmt. Angegeben sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen, bei denen zusätzlich Tiron (10mM), Tempol (1mM), oder L-NMMA (100 $\mu$ M) inkubiert wurde.

#### IV.3.5. Reaktive Stickstoffderivate als second messenger

Aus Endothelzellen wurde erstmals eine NO-Synthase isoliert und kloniert. Die mit diesem Enzymsystem verbundene Produktion von NO $\cdot$  ist allerdings sehr komplex und unter anderem von einer Reihe von Kofaktoren abhängig, die ebenfalls reguliert werden. In Tabelle 10 sind publizierte Daten zusammengestellt, die sehr heterogene NO $\cdot$ -Produktionsraten erkennen läßt. Es wird offensichtlich, daß ganz unterschiedliche Mengen sowohl im „Ruhezustand“, als auch unter Stimulationsbedingungen produziert werden können. Diese Probleme ergeben sich zum Teil aus methodischen Gründen, die für die Quantifizierung von reaktiven Sauerstoffderivaten natürlich ebenso gilt. Beispielsweise können akkumulierende Methoden (Griess, Chemilumineszenz, Oxyhämoglobin) nur ungenügend die dynamischen NO $\cdot$  Produktionen erkennen, die mit amperometrischen Methoden innerhalb von Sekunden erfasst wurden. Ebenso, wie mechanische Stimulationen reaktiven Sauerstoff produzieren können (Tabelle 8) reagieren Endothelzellen vor allem auf Schubspannung mit einer vermehrten NO $\cdot$ -Produktion. Physiologischerweise scheint dies der relevanteste Stimulus in vivo überhaupt zu sein. Erhöhte Schubspannung führt intravital in koronaren Endothelzellen des Kaninchens wahrscheinlich unabhängig von  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen zur Freisetzung von EDRF [329]. Schubspannungsinduzierte NO $\cdot$ -Produktion kann in bovinen oder humanen Endothelzellen eine erhöhte eNOS bedingen [482, 346]. Gleichzeitig kann damit auch die Expression der SOD hochreguliert werden [522, 110]. Neben der Regulation des Gefäßtonus und der Hemmung der Thrombozytenaggregation kann so produziertes NO $\cdot$  das Wachstum glatter Muskelzellen hemmen. Diese Ergebnisse bilden u.a. die Grundlage der vaskulären Remodellierung. Dabei wird davon ausgegangen, daß eine Erhöhung der Schubspannung über „gesunden“ Endothelien vermehrt NO $\cdot$  produziert, und einem Intimawachstum entgegensteuert [411].

Tabelle 10: Aus Endothelzellen freigesetztes NO<sup>•</sup>.

Typ	Methode	Basalproduktion	Stimulus	Zuwachs	Literatur
PAEC	Amp.	-	Bradykinin (2nM)	450 nM	[308]
HUVEC	Amp.	260 nM	Bradykinin (100 nM)	+22 %	
			Ionomycin (4 µM)	+92 %	[476]
HUVEC	Amp.	35 nM	IGF (20 ng/ml)	+400 %	[477]
HUVEC	Amp.	-	Histamin (10µM)	60 nM	[383]
HUVEC	Amp.	5 nM	Histamin (10µM)	+800 %	[280]
BAEC	Amp.	-	Schubsp. (10 dyn/cm <sup>2</sup> )	140nM	[241]
HUVEC	Hb	270 nM	Histamin (10µM)	+80 %	[383]
PAEC	Hb	-	A23187 (10µM)	0,65 nmol/h/10 <sup>6</sup>	[334]
PAEC	Hb	0,28 nmol/h/10 <sup>6</sup>	Bk (100 nM)	+180 %	[243]
HUVEC	Griess	70 nM	Histamin (10µM)	+300 %	[383]
HUVEC	Griess	3,3 nmol/mg/h	Schubsp. (25 dyn/cm <sup>2</sup> )	+3000 %	
			Bk (20 nM)	+500 %	[270]
HUVEC	Griess	70 pmol/min/10 <sup>6</sup>	VEGF	+100 %	[429]
HAEC	Griess	2 pmol/min/10 <sup>6</sup>			[532]
ECV	Griess	150 pmol/min/10 <sup>6</sup>	VEGF	+55 %	[429]
HUVEC	Griess	60 pmol/min/10 <sup>6</sup>	VEGF	+120 %	[429]
RAEC	CL	0,5 pmol/µg/h	Angiotensin II (100 nM)	+60 %	[386]
PCAEC	CL	8,3 nmol/µg	A23187 (3µM)	+70 %	[529]
BPAEC	<sup>14</sup> C-Ar.	129 pmol/h/mg			[532]
BAEC	DAF	50 nmol/h/mg	Bradykinin (1µM)	+200 %	[337]
BAEC	DAF	-	Östradiol (100 nM)	+ 120%	[170]
BAEC	DAF	-	Ceramid (5 µM)	+ 100%	[224]

Amp.= amperometrisch, wobei z.B. porphyrinbasierte Redoxpotentiale gemessen werden; Hb = Oxyhämoglobin, das über NO<sup>•</sup> zu Methämoglobin wird und eine Absorptionsänderung zeigt; Griess = NO<sub>2</sub><sup>-</sup> wird in einen Diazofarbstoff überführt; CL = Chemilumineszenz, bei der NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und andere Nitrosoverbindungen in NO<sup>•</sup> überführt und in der Gasphase mit einer Ozonreaktion nachweisbar ist; <sup>14</sup>C-L-Arg. = Enzymatischer Umbau von L-Arginin zu Citrullin durch NOS; IGF = insulin-like growth factor; Schubsp. = Schubspannung; VEGF = 20 ng/ml vascular endothelial growth factor.

### IV.3.6. Endotheliale Signale reaktiver Stickstoffderivate durch proinflammatorische Mediatoren

Die zelltypenabhängigen Aktivitätsunterschiede der NO<sup>•</sup> produzierenden Enzyme sind enorm [532]. Auch ist nicht regelhaft mit einer Aktivitätssteigerung nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen in Endothelzellen zu rechnen [404, 179], sodaß die meisten Untersuchungen hochdosierte Zytokinkombinationen über längere Zeiträume nutzen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Endothelial freigesetztes NO<sup>•</sup> nach proinflammatorischer Stimulation

Typ	Methode	Basalproduktion	Stimulus	Zuwachs	Literatur
Ea.hy926	Hb	0,3 nmol/mg/min	Cytomix <sup>1</sup>	+330 %	[157]
Ea.hy926	Griess	5,6 µM	Cytomix* <sup>52</sup>	+375 %	[156]
BAEC	Griess	< 100 nM	Cytomix* <sup>3</sup>	10,4 µM	[187]
BCoEC	Griess	10 pmol/10 <sup>6</sup>	Cytomix* <sup>4</sup>	+7100 %	[106]
RDMEC	Griess	3 nM	Cytomix* <sup>5</sup>	+950 %	[333]
RLMEC	Griess	5 nM	Cytomix* <sup>5</sup>	+200 %	[333]
HUVEC	CL	-	+Cytomix <sup>6</sup>	+0%	[404]
HUVEC	CL	-	+Cytomix <sup>6</sup> /Histamin	+200%	[404]
HUVEC	<sup>14</sup> C-Ar.	0,6 pmol/mg/min	+Cytomix <sup>6</sup>	+66%	[404]
HAEC	<sup>14</sup> C-Ar.	6 pmol/h/mg	+Cytomix <sup>7</sup>	+66%	[532]
Ea.hy926	DAF	-	Cytomix <sup>8</sup>	+120 %	Abb. 25

Hb = Oxyhämoglobin, das über NO<sup>•</sup> zu Methämoglobin wird und eine Absorptionsänderung zeigt; Griess = NO<sub>2</sub><sup>-</sup> wird in einen Diazofarbstoff überführt; CL = Chemilumineszenz, bei der NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und andere Nitrosoverbindungen in NO<sup>•</sup> überführt und in der Gasphase mit einer Ozonreaktion nachweisbar ist; <sup>14</sup>C-L-Arg. = Enzymatischer Umbau von L-Arginin zu Citrullin durch NOS; Cytomix<sup>1</sup> = 48 h 200 U/ml TNF-α + 200 U/ml IFN-γ + 2 µg/ml LPS; Cytomix<sup>2</sup> = 24 h 100 U/ml TNF-α + 25 U/ml IL-1; Cytomix<sup>3</sup> = 48 h 200 U/ml IFN-γ + 5000 U/ml TNF-α; Cytomix<sup>4</sup> = 48 h 100 U/ml IFN-γ + 100 U/ml TNF-α + 1 µg/ml LPS; Cytomix<sup>5</sup> = 48 h 25 U/ml IFN-γ + 10 µg/ml LPS; Cytomix<sup>6</sup> = 200 U/ml TNF-α + 5 U/ml IL-1 + 200 U/ml IFN-γ; Cytomix<sup>7</sup>: 6 h 0,1 µg/ml LPS, 500 U/ml IFN-γ, 20 ng/ml IL-1, 10 ng/ml TNF-α; Cytomix<sup>8</sup>: 48 h 1000U/ml IFN-γ, 5 ng/ml IL-1, 10 ng/ml TNF-α.

Ganz offensichtlich scheinen Endothelzellen auf gleiche Stimuli sowohl reaktive Sauerstoffderivate als auch NO<sup>•</sup> zu produzieren. Eine solche Gleichzeitigkeit ist für eine ganze Reihe von Agonisten gezeigt worden [260, 386]. Diese Gleichzeitigkeit führt theoretisch zu sehr komplexen Interaktionen, sodaß zahlreiche Mediatoren auch als Balancemodulatoren verstanden werden können. So kann eine



vermehrte  $\text{NO}^\cdot$  Produktion durch Östradiol über eine verminderte Superoxidproduktion erklärt werden [33]. Umgekehrt kann eine vermehrte Superoxidproduktion nach Hemmung der endogenen  $\text{NO}^\cdot$  Produktion gefunden werden [330] oder der Mangel an Tetrahydrobiopterin die  $\text{NO}$ -Synthase zur Superoxidproduktion, statt der  $\text{NO}^\cdot$ -Produktion anregen [91]. Untersuchungen zu kompartimentierten intraendothelialen Produktionsstätten von sowohl reaktiven Sauerstoffderivaten als auch reaktiven Stickstoffderivaten (z.B. Caveolae) erlauben ebenfalls eine Regulation [370]

Es ist also klar geworden, daß eine feine Balance besteht, die eine Reihe von Möglichkeiten zuläßt, die Menge beider Molekülgruppen zu regeln und damit auch einem dramatischen Überproduktionskollaps entgegenzuwirken. Ein quantifizierbares Summenmaß für ein Gleichgewicht fehlt allerdings.

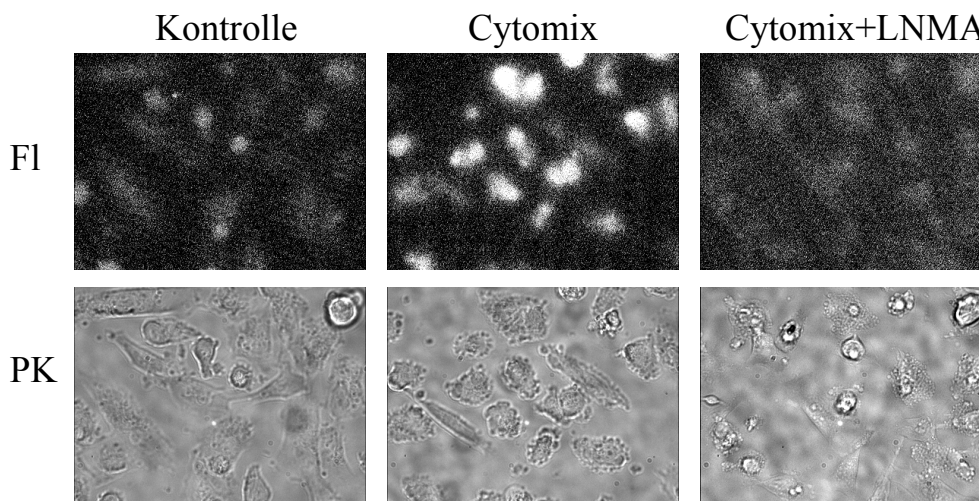


Abb. 25: Fluoreszenzaufnahme von Ea.hy 926 Zellen nach Beladung mit dem  $\text{NO}^\cdot$  sensitiven Farbstoff DAF-2.

In der oberen Reihe sind digitale Fluoreszenzaufnahmen (FL) von Zellen nach Behandlung nur mit dem Kulturmedium, nach kombinierter Zytokinstimulation (10 ng/ml  $\text{TNF-}\alpha$ , 5 ng/ml IL-1 und 100 U/ml  $\text{IFN-}\gamma$ ), sowie zusätzlicher Inkubation mit LNMA (100  $\mu\text{M}$ ) über 48 h gezeigt. In der unteren Reihe sind die dazugehörigen Phasenkontrastaufnahmen (PK) dargestellt.

#### **IV.4.    Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate regeln endotheliale Funktionen im Rahmen einer Sepsis**

Sepsis ist definiert worden als die systemische Reaktion auf eine Infektion [50]. In der überwiegenden Zahl der Fälle wird die Infektion von Bakterien verursacht, wobei sich gram positive und gram negative Keime in etwa die Waage halten. Die potentesten Initiatoren für die Aktivierung einer ganzen Reihe von Mediator-kaskaden scheinen Lipopolysaccharide der Zellmembran gram negativer Bakterien, bzw. Lipoteichonsäure und Peptidoglykan gram positiver Bakterien, oder auch sezernierte Toxine zu sein. All diese bakteriellen Produkte sind isoliert in der Lage in tierexperimentellen Modellen Aspekte septischer Patienten zu induzieren. Zu den charakteristischen klinischen Veränderungen im Verlaufe einer Sepsis zählen hyperdynamische Phasen mit Tachykardie und hohem Herzzeitvolumen, generalisierte Ödembildungen, eine Aktivierung des Gerinnungssystems bis hin zu diffusen Blutungen, Bewußtseinsstörungen und über zunehmende Organfunktionsstörungen schließlich zum Mehrorganversagen.

Es ist nunmehr unbestritten, daß Endothelzellen enorm wichtig für die kritische Balance eines Vasomotorentonus, der Adhärenz und Abhalten zirkulierender Zellen, Pro- und Antikoagulation, Permeabilität und auch des Sauerstoffverbrauchs sind. All diese Funktionen scheinen bei der Sepsis gestört, wobei unklar bleibt, ob eine endotheliale Dysfunktion Ursache oder Folge klinisch faßbarer Störungen, wie z.B. die der Blutung, der Ödembildung und des Organversagens, darstellt. Wie eng Endothelzellen mit septischen Veränderungen über eine Dysbalance reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate verbunden sind soll in den folgenden Kapiteln aufgezeigt werden

#### IV.4.1. Endotheliale Infektion und Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate

Nahezu alle relevanten bakteriellen Keime, Viren, Parasiten und Pilze können Endothelzellen infizieren [499]. In den meisten der untersuchten Fälle geht eine solche Infektion mit einer endothelialen Aktivierung (vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, prothrombotische Oberfläche, Zytokinsekretion) einher. Einige Bakterien können  $H_2O_2$  produzieren und damit Einfluß auf endotheliale Funktionen nehmen. Streptolysin S, ein Hämolyysin von Streptokokken, oder Pyochelin von *P. aeruginosa* steigert die Toxizität von  $H_2O_2$  [167, 57]. RBMEC können nach Inkubation mit *S. pneumoniae* vermehrt  $O_2^{\cdot-}$  produzieren [253] und eine Infektion von EA.hy 926 und HUVEC mit *R. rickettsii* führt zu einem Abfall von Glutathion, einem Abfall der Glutathionperoxidaseaktivität und einem Anstieg intrazellulärer Peroxide [204]. Bakterien können über Denitrifikationen  $NO^{\cdot}$  bilden und auch eine eigene NOS besitzen [81]. Bakterielle Sekretionsprodukte sind gleichfalls in der Lage in Endothelzellen eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffderivate und Stickstoffderivate zu bilden. Neben den am besten untersuchten Lipopolysacchariden gram negativer Bakterien können auch andere Sekretionsprodukte wie z.B. *E. coli*-Hämolyysin [458] eine endotheliale  $NO^{\cdot}$  Produktion verstärken. Gram positive Bakterien scheinen ebenfalls über Zellwandbestandteile [149], oder die Sekretion von Toxinen [458] dazu in der Lage.

Für Menschen mit Sepsis kann davon ausgegangen werden, daß sowohl eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffderivate, als auch reaktiver Stickstoffderivate vorhanden ist (Tabelle 10). Allerdings bleibt völlig unklar, welche zellulären Quellen dafür verantwortlich sind, ob das Vorhandensein den pathologischen Prozeß unterhält, oder als Reaktion der Erkrankung gefunden wird.

Tabelle 12: Indikatoren für reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate in Patienten mit Sepsis

Literatur	Patienten	Klinische Form	Indikator
[174]	16	septischer Schock	Retinol↓, Tocopherol↓, β-Carotin↓, TBARS↑
[93]	15	schwere Sepsis	* Antioxidatives Potential ↓
[158]	26	Sepsis	TBARS ↑
[154]	14	Sepsis	XOD ↑, Ascorbylradikal ↑, Lipidperoxide↑
[153]	8	Sepsis	Vitamin C↓, Bleomycin-detektierbares Eisen↑
[155]	30	Sepsis	Vitamin C↓, Lipidperoxide↑
[349]	17	Sepsis	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[136]	12	septischer Schock	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[128]	23	Sepsis, septischer Schock	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[173]	29	septischer Schock	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[16]	13	septischer Schock	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[465]	20	Sepsis	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[114]	53	Sepsis (Kinder)	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[439]	46	SIRS, Sepsis (Kinder)	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[120]	30	Sepsis (Kinder)	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[521]	31	Sepsis (Kinder)	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[266]	22	septischer Schock (Kinder)	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[23]	11	septischer Schock	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - ↑
[259]	11	Sepsis	endotheliale Nitrotyrosine ↑
[151]	3	septischer Schock	NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> -, plasmatische Nitrotyrosine ↑
[261]	3	Sepsis	endotheliale Nitrotyrosine ↑

\*Antioxidative Kapazität ist definiert worden als die Fähigkeit des Plasmas eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Ferryl-myoglobin-Produktion von Metmyoglobin zu bilden; TBARS, Thiobarbitursäure reaktive Substanzen; XOD, Xanthinoxidase.

Proinflammatorische Mediatoren, die im Rahmen der Sepsis eine bedeutende Rolle spielen, können in Endothelzellen ebenfalls vermehrt reaktiven Sauerstoff produzieren (Tabelle 9). Die meisten Hinweise für die Bedeutung reaktiver Sauerstoffderivate bei der Regulation eines aktivierten endothelialen Phänotyps existieren werden mit dem inhibitorischen Potential unterschiedlicher Antioxidantien begründet [392, 12, 98, 327]. Bei aller Komplexität scheinen die meisten Untersuchungen darauf hinzuweisen, daß eine vermehrte NO<sup>•</sup>-Produktion nur nach hochdosierter kombinierter Stimulation erfolgt (Tabelle 11).

Ob mit einer geänderten endogenen Produktionsrate reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate protektive, oder schädigende Wirkungen verbunden sind ist kontrovers. Beispielsweise schützt eine subtoxische Exposition mit Peroxynitrit eine nachfolgende Schädigung durch TNF- $\alpha$  in BPAEC [380]. Als protektive Wirkung können beispielsweise in transformierten Mausendothelien nach einer kombinierten proinflammatorischen Stimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (und IL-1) über eine vermehrte NO-Synthese *R. conorii* [503] und *S. mansoni* [358] abgetötet werden.

Die Regulation der in Endothelien vorhandenen NO-Synthasen scheint gleichfalls komplex. LPS führt in BAEC zu einer vermehrten Expression von eNOS [239], wohingegen TNF- $\alpha$  eNOS in BAEC [275, 344] und in HUVEC reduziert [536]. LPS und TNF- $\alpha$  können in BAEC, PAEC und in ECV 306 Zellen eine Erniedrigung der NO-Produktion induzieren [179, 342, 101]. Die Regulation der iNOS, die zu wesentlich höheren NO-Produktionsraten fähig ist unterliegt dem Einfluß zahlreicher proinflammatorischen Stimuli mit erheblichen Zelltypvariabilitäten [148]. Von allen die Endothelien umgebenden Zellen ist mittlerweile bekannt, daß auch sie in der Lage sind über nur unvollständig verstandene Regulationswege sowohl NO als auch reaktive Sauerstoffderivate zu produzieren. Das gilt insbesondere für glatte Muskelzellen, die unter Umständen weitaus potenter als Endothelzellen sein können. Die alleinige Präsenz von iNOS reicht nicht, eine veränderte NO-Produktion anzunehmen [63]. Eine ganze Reihe von Cofaktoren, wie SOD, NADH, Calmodulin, Tetrahydrobiopterin, und Arginin bestimmen die Synthesefähigkeit dieses Enzyms [91]. Endothelien sind daneben in der Lage einen endogenen Inhibitor, das asymmetrische Dimethylarginin, zu produzieren [233]. Darüber hinaus ist eine vermehrte Expression von iNOS unter bestimmten Bedingungen durchaus sinnvoll und kann mit protektiven Effekten verbunden sein [369]. Mit einer ganzen Reihe von neueren selektiveren iNOS-Inhibitoren können beispielsweise auch Wundheilungsstörungen erwartet werden [445]. Bei Patienten mit Sepsis kann zwar in zirkulierenden Zellen eine erhöhte Expression [478] aber ohne Funktion [398] gefunden werden. Da grundsätzlich NO-Synthasen in der Lage sind auch O<sub>2</sub><sup>-</sup> [381, 420, 526, 527] oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [263] zu produzieren, kann auch eine erhöhte NOS zu erhöhten Superoxidproduktionen beitragen und umgekehrt eine Inhibition dieses Enzymsystems die Superoxidproduktion reduzieren [330].

#### IV.4.2. Interaktionen zirkulierender Zellen mit Endothelzellen in der Sepsis

Für gewöhnlich wird jede zirkulierende Zelle von der endothelialen Oberfläche abgehalten. Verantwortlich dafür scheint die elektrische Nettoladung, biomechanische Charakteristika fließenden Blutes und natürlich die endotheliale Sekretion von NO zu sein. Berühren zirkulierende Zellen eine Endothelzelle, so kann ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal induziert werden [547], wobei die funktionelle Konsequenz noch unklar ist. Aktivierte Endothelzellen sind potente Produzenten von Zytokinen und Chemoattraktoren über die eine Interaktion mit zirkulierenden Zellen eingeleitet werden kann [28]. Enorme Bedeutung für leukozytär-endotheliale Interaktionen ist die bekanntermaßen stimulus-, zelltyp-, zeit- und organspezifische Regulation zahlreicher Adhäsionsmoleküle auf der endothelialen Oberfläche [372, 362]. Eine Übersicht über die komplexe Regulation dieser Interaktion findet sich bei [183]. Darüber hinaus sind Adhäsionsmoleküle nicht nur passive Anker-moleküle, sondern auch als Rezeptoren biologisch aktiv. Sie sind Rezeptoren zur Signaltransduktion und Antagonisten im zirkulierenden Blut. Lösliche Formen von Adhäsionsmolekülen können auch bei Menschen mit Sepsis in erhöhtem Masse gefunden werden (Tabelle 13), die Interpretation ihrer Funktionalität bleibt spekulativ.

Tabelle 13: Lösliche Adhäsionsmoleküle bei Patienten mit Sepsis

Literatur	Patienten	Klinische Diagnose	Indikator
[325]	19	Sepsis, ARDS	sICAM-1↑
[95]	67	Sepsis	sE-Sel↑
[124]	16	schwere Sepsis	sE-Sel↑, sICAM-1↑
[242]	25	Sepsis	sE-Sel↑, sICAM-1↑
[480]	71	Sepsis, Malaria	sICAM-1, sVCAM-1, sE-Sel ↑
[160]	12	Mediterranean spotted fever	cEC↑
[47]	40	Sepsis	sICAM-1↑, sVCAM-1↑

sE-Sel = lösliches E-Selektin; sVCAM-1 = lösliches Vascular Cell Adhesion Molecule 1; sICAM-1 = lösliches Intercellular Adhesion Molecule 1; sEPCR = löslicher endothelialer Protein C Rezeptor; cEC = zirkulierende Endothelzellen

Die Interaktion von Neutrophilen mit Endothelzellen kann über die Produktion von reaktiven Sauerstoffderivaten toxisch sein und eine unkontrollierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten ist durchaus in der Lage zu einer Gewebeschädigung beizutragen. Zahlreiche tierexperimentelle Modelle belegen eine direkte endotheliale Schädigung [438, 196] und spiegeln nur begrenzte Aspekte der klinischen Realität wider [76]. Eine endotheliale Apoptose kann in tierexperimentellen Modellen massiv auftreten [192], wobei dies allerdings bei Menschen nicht der Fall zu sein scheint [210]. Neuere experimentelle Ansätze zeigen, daß Leukozyten eine endotheliale Apoptose inhibieren können [354] und auch Endothelzellen in der Lage sind, leukozytäre Funktionen zu inhibieren [168]. Transmigrierende Neutrophile können zu einer Wiederversiegelung der endothelialen Integrität beitragen [284]. Es gibt kaum Daten über die endotheliale Vitalität in Patienten mit Sepsis. Ob eine unkontrollierte Überaktivierung neutrophiler Granulozyten bei septischen Patienten überhaupt vorliegt, kann bezweifelt werden und auch eine massive leukozytäre Extravasation in septischen Patienten ist fragwürdig [501].

#### IV.4.3. Endotheliale Permeabilität in der Sepsis

Endothelzellen regeln den transvaskulären Austausch von Flüssigkeiten, Metaboliten und auch ganzen Zellen. Dafür können transzelluläre vacuoläre Kanäle oder auch parazelluläre Wege benutzt werden. Die parazelluläre Permeabilität, an der eine ganze Reihe von Proteinen beteiligt ist wird wahrscheinlich über einen aktiven Kontraktionsvorgang an Myosin geregelt. Die hierbei am besten untersuchten Regelwege zeigen generell, daß mit einer Erhöhung von cAMP kultivierte Endothelzellmonolayer dicht gehalten werden, wobei dem cGMP eine unterstützende Funktion in humanen aorten and dermalen Gefäßen zukommt [116]. Eine Retraktion kann über die Erhöhung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration induziert werden, die allerdings von cAMP aufgehoben wird [323].

Anstiege der endothelialen Permeabilität können durch Exotoxine von *S. aureus*, *P. multocida* und *P. aeruginosa* [459, 133, 457] oder auch Endotoxine [107, 31, 32] und proinflammatorische Mediatoren [7, 254] induziert werden. Eine  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Hyperpermeabilität kann über NO-Donatoren in PPAEC aufgehoben [460], in BPAEC verstärkt [352, 318] oder keinen Einfluß haben [94]. Die produzierten relativen Mengen und die Umgebungsbedingungen modulieren also wahrscheinlich die kombinierten Wirkungen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate auch hinsichtlich der Permeabilität [351]. Zahlreiche tierexperimentelle Modelle können eine erhöhte vaskuläre Permeabilität in unterschiedlichen Gefäßbetten finden. Beispielsweise steigt in *E. coli* infundierten Ratten in venösen Gefäßen die Permeabilität, die über die Antioxidantien N-Acetylcystein oder Tirilazad Mesylat unterdrückbar ist [419, 418].

Klinisch ist das Auftreten von Ödemen bei Patienten mit Sepsis ganz offensichtlich und Untersuchungen mit der venösen Stauungsplethysmographie und über differentielle Distributionsvolumina von Glukose und Albumin weisen auch auf eine erhöhte Filtrationskapazität als Ausdruck einer sehr früh gestörten Endothelfunktion bei septischen Patienten hin [82][232].



#### IV.4.4. Endotheliale Kontrolle der plasmatischen Gerinnung bei Sepsis

Die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems erfolgt in vivo prinzipiell über die Expression von TF. TF ist in der Lage über die Aktivierung von Faktor VII den Faktor X, oder Faktor IX zu aktivieren. Aktiverter Faktor X spaltet dann im Komplex mit Faktor V Prothrombin zu Thrombin, dem wahrscheinlich potentesten Gerinnungsaktivator, der das Fibrinogen in Fibrin überführt. Die Inhibition dieser Aktivator-kaskaden erfolgt unter normalen Umständen sofort über TFPI (tissue factor pathway inhibitor), der TF in seiner Funktion hemmt. Daneben kann das Thrombin über die Bindung an Thrombomodulin einen Komplex bilden, der das Protein C, wenn es an den endothelialen Protein C-Rezeptor gebunden hat aktiviert. Wahrscheinlich muss das aktivierte Protein C wieder dissoziieren um mit Protein S im Komplex die Faktoren Va und VIIIa zu inhibieren. Heparin und auch auf der endothelialen Oberfläche vorhandene Glycosaminoglykane binden Antithrombin, das zusammen mit dem Protein C/S System das potenteste Thrombininhibitorsystem darstellt [132]. Die Auflösung einer Fibrinbildung läuft ebenfalls auf endothelialer Oberfläche ab. Das hierfür notwendige Plasmin entsteht vorwiegend aus Gewebe-Plasminogenaktivator (tPA), der von dem Plasminogen-Aktivatorinhibitor (PAI-1) inhibiert wird. Beide Faktoren, tPA und PAI-1, werden von Endothelzellen synthetisiert, wobei das tPA normalerweise im Überschuss vorhanden ist. Die wichtigsten Aktivatoren für Thrombozyten können aus Endothelien stammen. Hierzu zählt der Plättchen-Aktivierende Faktor (PAF) und der von Willebrandt-Faktor. Endothelzellen scheinen die einzig relevanten Produzenten des vWF zu sein. Dieser Faktor kann im Plasma den Faktor VIII vor proteolytischem Abbau schützen und an der zellulären Oberfläche über Glykoproteinrezeptoren Thrombozyten binden und miteinander vernetzen.

Prinzipiell bilden Endothelzellen über den extrazellulären Glycosaminoglykan-Antithrombin III -Komplex, Thrombomodulin, den tissue factor pathway inhibitor (TFPI), die Produktion von Adenosin über Ekto-ADPasen, die Sekretion von Protein S, Prostacyclin und natürlich auch NO<sup>•</sup> eine antithrombotische Oberfläche. Die NO<sup>•</sup> Produktion scheint dabei eine zentrale Rolle einzunehmen, da

beispielsweise das Heparansulfat [231] und auch die Prostacyclinsekretion [509] davon abhängen können. Ein geschädigtes Endothel führt in vitro fast regelhaft zu einer prothrombotischen Transformation. TF kann auf der endothelialen Oberfläche durch Bakterien, LPS, IL-1 und TNF- $\alpha$  in allen untersuchten Zelltypen erhöht werden. Proinflammatorische Stimulatoren einschließlich reaktiver Sauerstoffderivate können Endothelzellen zur Sekretion des PAF [288] und auch des vWF [492] anregen. Umgekehrt kann die Thrombomodulinexpression auf HUVEC über LPS, IL-1 und TNF- $\alpha$  erniedrigt werden [203, 254]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) dagegen kann über NO $\cdot$  [269, 424] eine IL-1, TGF- $\beta$  und LPS induzierte Suppression von Thrombomodulin antagonisieren [65]. IL-1 und TNF- $\alpha$  reduzieren endotheliales tPA und erhöhen PAI-1 [416]. Die Induktion des PAI-1 kann dabei über die endogene Produktion reaktiver Sauerstoffderivate erfolgen [350]. In der Summe würde zumindest in vitro die proinflammationsbedingte Inhibition der Fibrinolyse eine frühe Thrombenbildung unterstützen.

Tierexperimentelle Sepsis-Modelle können eindrucksvolle Aktivierungen des plasmatischen Gerinnungssystems erzeugen, wobei der endotheliale Beitrag unklar ist. Als Ausdruck einer endothelialen Beteiligung kann beispielsweise eine reduzierte Antithrombin III – Bindung and das Endothel im Intestinum im Nagermodell gezeigt werden (Abb. 26)[387].

Endothelzellen sind sicher nicht als einfache Initiatoren einer komplexen prokoagulatorischen Gesamtsituation in der Sepsis zu betrachten. Eine Dysbalance endothelialer Aktivator- und Inhibitorsysteme lässt sich wahrscheinlich aus der Summe der meisten Untersuchungen postulieren. In einer neueren Arbeit mit einem LPS-Primatenmodell konnte beispielsweise der endotheliale Protein C Rezeptor als Schutzsystem beschrieben werden [466].

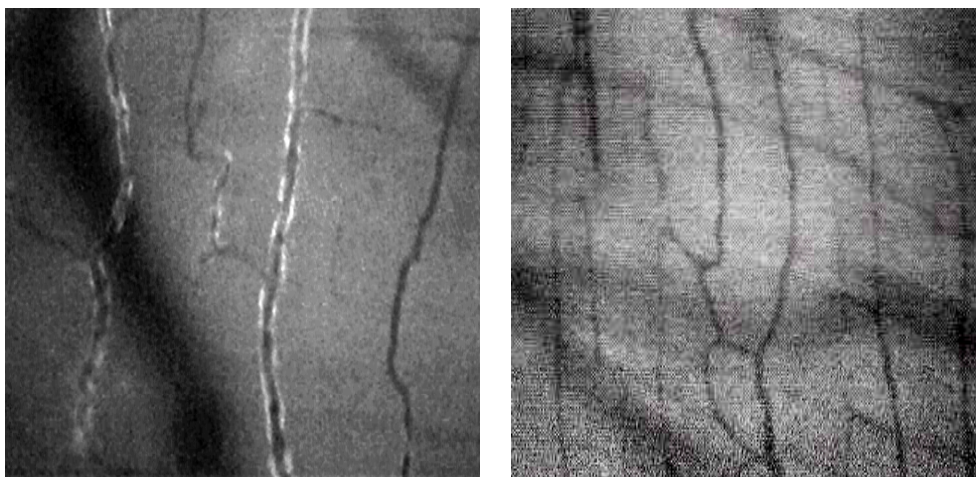


Abb. 26: Endotheliale AT-Bindung als Ausdruck einer Schädigung.

Im linken Bild wurden Ratten mit NaCl und im rechten Bild mit LPS (50mg/kg, 4h) behandelt. Dargestellt sind intravitale Fluoreszenzaufnahmen eines FITC-markierten anti-AT Antikörpers (Centeon, Marburg), wobei im rechten Bild keine AT-Bindung erkennbar ist.

Patienten mit Sepsis zeigen eine Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems [312]. Die primäre Ursache einer aktivierten plasmatischen Gerinnung bei septischen Patienten bleibt allerdings unklar. Isolierte mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge aus Patienten, die an einem ARDS litten zeigen zwar eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität [180], dennoch hat eine relevante Erhöhung von TF auf Endothelzellen bisher weder in tierexperimentellen Studien, noch bei Menschen mit Sepsis gezeigt werden können [131, 66, 357]. Ein endothelzellspezifischer Repressor scheint hierfür verantwortlich zu sein. Eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung kann entweder über die bakteriellen Oberflächen selbst, oder über aktivierte Monozyten erfolgen. Inhibitoren mit antikoagulatorischer Potenz (z.B. AT, TFPI) werden zwar zur Zeit in sehr großen multizentrischen Studien auf ihre Wirksamkeit bei septischen Patienten geprüft, ihre endotheliale Wirkung bleibt aber spekulativ.

Tabelle 14: Lösliche Marker für endotheliale Aktivierung im Gerinnungssystem von Patienten mit Sepsis

Literatur	Patienten	Klinische Diagnose	Indikator
[409]	45	Sepsis	svWF↑
[222]	60	Sepsis	sTM↑
[325]	19	Sepsis, ARDS	sTM↑, svWF↑
[242]	25	Sepsis	svWF↑
[265]	22	septischer Schock	sTM↑
[314]	32	SIRS	svWF↑
[129]	42	Sepsis, DIC	sTM ↑
[272]	16	Sepsis	s EPCR↑
[160]	12	Mediterranean spotted fever	sTM↑, svWF↑
[47]	40	Sepsis	sTM↑
[297]	32	Sepsis	sTM↑, t-PA↑, vWF↑

SvWF = löslicher von Willebrandt Faktor; sTM = lösliches Thrombomodulin, sEPCR = löslicher endothelialer Protein C Rezeptor; cEC = zirkulierende Endothelzellen

#### IV.4.5. Endothelabhängige Vasoregulation in der Sepsis

Die größte Bedeutung von Endothelzellen für die vaskuläre Biologie liegt wahrscheinlich in ihrer Fähigkeit den Gefäßtonus zu regulieren. Neben der ursprünglichen Potenz zur Bildung von Prostacyclin nimmt die endotheliale NO<sup>•</sup>-Produktion ganz entscheidend an dieser Regulation teil. Mitte der 80er Jahre konnte zunächst von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> gezeigt werden, daß es einen endothelabhängigen relaxierenden Faktor (EDRF) inaktiviert. Mittlerweile geht man auch von direkten vasoregulatorischen Effekten unterschiedlicher reaktiver Sauerstoffspezies vor allem in der zerebralen und koronaren Zirkulation aus. Als klar wurde, daß NO<sup>•</sup> wahrscheinlich der potenteste EDRF ist, begann eine wahre Flut von Untersuchungen. Aber auch andere Moleküle können von Endothelzellen zur Vasorelaxierung produziert werden. Hierzu zählen EDHFs, von denen Epoxyeicosatriensäuren, Anandamid (der endogene Cannabinoidrezeptorligand) oder einfach nur die abluminale Sekretion von K<sup>+</sup> solche Faktoren sein können. Konzeptionell scheint in größeren Gefäßen die Schubspannung der wichtigste Stimulus für die Freisetzung von NO<sup>•</sup> zu sein, wohingegen die zyklische Dehnung physiologische EDHF-Freisetzung induziert. Neben diesen Relaxationsfaktoren sezernieren Endothelien Kontraktionsfaktoren wie z.B. das Endothelin, Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostaglandin H<sub>2</sub> oder Angiotensin II, die in ihrer Regulation gleichfalls bei septischen Patienten gestört sind.

Ein charakteristisches Merkmal für die Sepsis ist die heterogene Verteilung von Vasokonstriktion und Vasodilatation in unterschiedlichen Organen, die in der Summe zu einem Abfall des totalen peripheren Widerstandes mit regionalen Maldistributionen des Blutflusses führt. Endothelabhängige Vasoregulation unter den Bedingungen einer Sepsis ist in weiten Teilen nur in tierexperimentellen Modellen untersucht worden. Bereits 1985 wurde ein endothelabhängiges Versagen der Vasoregulation vermutet [9, 8] und in einem Rattenmodell konnte eine verminderte Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion nach mechanischer Entfernung des Endothels aufgehoben werden [317]. In der Folge war in unterschiedlichen Spezies, einschließlich des Menschen mit unterschiedlichen Sepsismodellen an unterschiedlichen Gefäßen mit unterschiedlichen Stimuli

einheitlich ein endothelabhängiges Relaxationsdefizit nachweisbar (Tabelle 15).

Tabelle 15: Endothelabhängige Relaxation ist in Sepsismodellen gestört

Species	Modell	Unters. Gefäß	Stimulus	Referenz
Ratte	LPS i.v.	A. mesenterica	ACh↓, Bk↓, SP↓, Hist↓	[8]
Ratte	LPS i.v.	A. mesenterica	Reaktive Hyperämie ↓	[9]
Ratte	LPS	A. pulmonaria	+EC: ET-1 ↓ (COX+ETB-R dep.) -EC: kein Effekt	[97]
Ratte	Faeces i.p.	A. coronaria	ADP ↓, SNP erh.	[508]
Ratte	Faeces i.p.	A. mesenterica	Clonidin↓, ADP↓, SNP+Pinacidil erh.	[67]
Ratte	CLP	Aorta	+EC: NE↓, -EC: NE erh.	[317]
Ratte	CLP	Aorta	ACh↓, SNP erh.	[505]
Ratte	CLP	Aorta, A. mesenterica	ACh ↓, NTG erh.	[506]
Ratte	CLP	Aorta	ACh ↓, NTG erh., NOS III↓	[545]
Meer.	LPS i.p.	Aorta, A. coronaria	ACh↓, ADP ↓ SP, A23187, SNP erh.	[364]
Meer.	LPS i.p.	Aorta	ADP↓, ACh ↓; SNP erh.	[366]
Meer.	LPS i.p.	Aorta	ACh ↓, A23187 erh.	[335]
Meer.	LPS i.p.	Aorta	ACh ↓, ATP erh.	[537]
Hase	Cytomix <sup>1</sup>	A. carotis	ACh-, SP-, A23187-EDHF↓	[244]
Hase	Cytomix <sup>1</sup>	A. coronaria	BK-, A23187-EDHF↓	[244]
Schwein	GBS	A. pulmonaria	BK↓	[515]
Schwein	P. aer.	A. pulmonaria	ACh↓, BK erh., SNP erh.	[238]
Schwein	LPS	A. coronaria	BK-EDHF↓	[267]
Schwein	LPS i.v.	A. coronaria	Fluß-induzierte Dilatation ↓	[271]
Hund	LPS i.v.	A. coronaria	ACh ↓, SNP, PGF2α, K <sup>+</sup> erh.	[365]
Hund	LPS i.v.	A. fem., ren., mesent.	ACh ↓, SNP, K <sup>+</sup> erh.	[524]
Katze	TNF-α	A. carotis	ACh ↓, SNP erh.	[11]
Mensch	LPS i.v.	V. dors. man.	BK ↓, AA ↓, GTN erh.	[44]
Mensch	Cytomix <sup>2</sup>	V. dors. man.	BK ↓, AA ↓, GTN erh.	[45]

Meer. = Meerschwein; +/-EC = An-, oder Abwesenheit des Endothels; NE = Norepinephrin; AA = Arachidonsäure; Ach = Acetylcholin; ADP = Adenosindiphosphat; P. aer. = *P. aeruginosa*; Cytomix<sup>1</sup> = LPS, TNF-α, Ifn-γ; Cytomix<sup>2</sup> = TNF-α, IL-1, IL-6; SP = Substanz P; A23187 = Ca<sup>2+</sup>-Ionophor; COX = Cyclooxygenase; SNP = Nitroprussid; NTG = Nitroglycerin; ET = Endothelin; BK = Bradykinin; EDHF = Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor; erh. = erhalten.

Kollektiv scheinen diese Untersuchungen zunächst auf einen gestörten rezeptorabhängigen intraendothelialen Signaltransduktionsprozess hinzuweisen, da in nahezu allen Fällen eine NO-Donator-induzierte also endothelunabhängige Vasorelaxation erhalten blieb. Wo genau eine solche Signalstörung liegt und ob auch bei Menschen mit dem klinisch komplexen Syndrom einer Sepsis eine solche

Signalstörung vorliegt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Die schubspannungsvermittelte endotheliale NO $\cdot$ -Produktion zur Relaxation, die möglicherweise für physiologische Vorgänge bedeutsamer ist, unterliegt einer noch wenig bekannten Regulation [108]. Ob eine schubspannungsabhängige Dysregulation der eNOS-Phosphorylierung in Sepsismodellen oder in Patienten nachweisbar ist bleibt ebenfalls abzuwarten.

Eine ganze Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen sind publiziert worden, die therapeutische Effekte hinsichtlich der endothelialen Funktion aufweisen. Für die endothelabhängige Relaxation scheinen nahezu alle publizierten Ansätze direkt, oder indirekt einen Einfluß auf die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate zu haben (Tabelle 16).

Tabelle 16: Therapie der endothelialen Vasoregulationsstörung in Sepsismodellen

Spezies	Modell	Gefäß	Behandlung	Vermutete Wirkung	Literatur
Ratte	LPS	Aorta	NOS II antisense	NOS III $\uparrow$	[206]
Ratte	CLP	Aorta	Pentoxifyllin	ROS $\downarrow$	[507]
Ratte	CLP	Aorta	Heparin/GM1892	NO $\cdot$ $\uparrow$	[324]
Ratte	LPS	Aorta	Tirilazad Mesylat	OH $\cdot$ $\downarrow$	[316]
Ratte	LPS	A. mesent.	hSOD, Tirilazad Mesylat	O $_2^{\cdot-}$ $\downarrow$ /LPO $\downarrow$	[433]
Ratte	LPS	Aorta	3-Aminobenzamid	OONO $\cdot$ $\downarrow$	[463]
Hase	LPS	Aorta	Perindopril	O $_2^{\cdot-}$ $\downarrow$	[485]

CLP = Zökale Ligation und Punktion; LPO = Lipidperoxidation; ROS = Reaktive Sauerstoffspezies.

Um die endotheliale Funktion bei Menschen quantifizieren zu können sind einige Methoden verfügbar. Endothelabhängige Relaxationen nach pharmakologischer Stimulation oder über induzierte Flussänderungen können über hochauflösende sonographische Techniken, oder auch angiographisch quantifiziert werden [89]. Die Datenlage zu definitiven Funktionsmessungen bei Patienten mit einer Sepsis sind extrem dürftig. Die reaktive Hyperämie prüft wahrscheinlich eine endothelabhängige Vasorelaxation, wenn der Gefäßdurchmesser und der Fluß adäquat quantifiziert werden kann. Indirekte Messungen an Menschen unterstützen ein endothelabhängiges Relaxationsdefizit [194, 19, 20]. Darüber hinausgehende Messungen sind beim Menschen nicht bekannt.



#### IV.4.6. Endothelabhängiger Sauerstoffverbrauch in der Sepsis

Frühe Untersuchungen zu globalen Messungen des Sauerstoffangebots und -verbrauchs bei Patienten mit Sepsis führten zu der Vorstellung einer Sauerstoffschuld [430]. Eine Sauerstoffschuld wurde begründet mit der Beobachtung, daß der Sauerstoffverbrauch selbst bei einer supranormalen Erhöhung des Sauerstoffangebotes ansteigt. Patienten mit Sepsis, die in der Lage sind nach unterschiedlichen Behandlungen ihren Sauerstoffverbrauch zu steigern, zeigten in zahlreichen Untersuchungen eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit. Leider konnten nachfolgende Studien, die eine supranormale Erhöhung des globalen Sauerstoffangebotes anstrebten, keine wesentliche Überlebenssteigerung erzielen [49]. Sobald eine schwere Sepsis vorliegt kann man definitionsgemäß auch von Zeichen einer Minderperfusion ausgehen (z.B. Hyperlaktatämie, metabolische Azidose). Dennoch scheint ein Sauerstoffmangel nicht notwendigerweise vorhanden zu sein, denn sowohl in tierexperimentellen Sepsismodellen, als auch in Patienten mit Sepsis können sogar erhöhte Gewebesauerstoffpartialdrücke gemessen werden [432]. Wenn also gleichzeitig normale Sauerstoffpartialdruckwerte und Zeichen einer Minderperfusion vorliegen, scheint ein Defekt der Sauerstoffverwertung vorzuliegen. Für eine solche Störung führte *Fink* den Begriff der zytopathischen Hypoxie ein [143].

Mit Hilfe ortsauflösender bildgebender Verfahren für Sauerstoff konnte die Arbeitsgruppe um Intaglietta feststellen, daß vor allem präkapillär der meiste Sauerstoff im Mesenterium der Ratte verbraucht wird. Dabei sind Endothelzellen die wahrscheinlichsten Verbraucher [473]. Endothelzellen sind am Sauerstoffverbrauch von Organen beteiligt. Werden Endothelzellen entfernt, so finden sich in Hundeextremitäten eine Reduktion des Sauerstoffverbrauchs um 33% [96].

Die exogene Zugabe von NO<sup>-</sup>-Donatoren hemmt reversibel unterschiedliche Komplexe der Atmungskette (Cytochrom C, Ubichinon). Endothelzellen regeln wahrscheinlich über die Produktion von NO<sup>-</sup> damit nicht nur

ihren eigenen Sauerstoffverbrauch [86], sondern auch den ganzer Organe [425]. Neuere Arbeiten an Mäusen, denen das e-NOS Gen ausgeschaltet wurde, belegen ebenfalls eine Reduktion des stimulierten Sauerstoffverbrauchs explantierter Herzen um 22% [296].

Die Exposition von isolierten Endothelzellen mit LPS senkt deren Sauerstoffverbrauch. Ebenso sinkt der Sauerstoffverbrauch septischer Mäuseherzen, bei normaler NO<sup>•</sup>-Produktionsfähigkeit, nicht aber in iNOS-defizienten Mäusen [296]. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf eine NO<sup>•</sup> induzierte Störung des Sauerstoffverbrauchs hin, der zumindest tierexperimentell von einer iNOS-Induktion abhängt. Für zelluläre Betrachtungen kommen allerdings weitere Möglichkeiten für einen Sauerstoffverbrauchsdefekt in Betracht. Eine Entkopplung der Atmungskette könnte über einen NADH-Mangel oder über eine mitochondriale Schädigung möglich sein. Der NADH-Mangel könnte entweder aufgrund eines Substratmangels (modellhaft beschrieben für die Aufnahme von Glutamin), oder eines erhöhten Verbrauchs möglicherweise über eine aktivierte PARS vorhanden sein. Eine mitochondriale Schädigung könnte aufgrund eines starken nitrosativen oder oxidativen Stresses möglich sein, oder aufgrund einer Öffnung der mitochondrial permeability transition pore (MPTP). Letztlich bleibt aber auch die Möglichkeit einer echten Hypoxie bei Patienten mit Sepsis in Organen, deren Messfähigkeit bisher nicht möglich ist. Mikrovaskuläre Shunts, die unter den Bedingungen einer Sepsis sogenannte schwache, oder vulnerable Perfusionseinheiten aufweisen, können mit entsprechend sensitiven Methoden zumindest tierexperimentell nachgewiesen werden [226].

#### IV.4.7. Endotheliale Toleranz in der Sepsis

Mit der Aktivierung einer inflammatorischen Reaktion werden physiologischerweise parallel Inhibitorsysteme eingeschaltet. Für mindestens sechs zytokin-induzierte Aktivierungen ist eine ganze Familie von intrazellulären Signalinhibitoren bekannt [6]. Das Phänomen der sogenannten LPS-Toleranz, eine verminderte oder fehlende Reaktion auf LPS nach vorausgegangener LPS-Exposition, ist lange schon bekannt. Eine geminderte ex-vivo Aktivierungsfähigkeit ist für Lymphozyten, Neutrophile und vor allem für Monozyten septischer Patienten mehrfach nachgewiesen. Die ursprüngliche Vorstellung einer ausschließlichen Hyperinflammation bei septischen Patienten ist falsch und neuere Arbeiten belegen, daß für Patienten mit Infektionen ein Überwiegen antiinflammatorischer Zytokine prognosebestimmend ist [486, 171]. Endogene Schutzsysteme können in Endothelzellen nach subletalem Stress aktiviert werden. Gerade vor diesem Hintergrund mehren sich neueste Untersuchungen, die zeigen, daß nach Exposition mit unterschiedlichen Stressoren eine endotheliale Aktivierbarkeit abnimmt. HUVEC, die nur 5 Minuten 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgesetzt wurden zeigten nach TNF- $\alpha$  Exposition eine deutlich reduzierte Expression von ICAM-1 und E-Selectin, sowie eine deutliche Reduktion der IL-6 und IL-8 Sekretionskapazität [538]. Die späten zytotoxischen Wirkungen von TNF- $\alpha$  (nach 72 h) in BPAEC konnten nach Vorbehandlung mit Peroxynitrit ebenfalls deutlich gemindert werden [380]. In RBEC, die über 4 h mit TNF- $\alpha$  vorbehandelt werden, kann nach 24 h keine Erhöhung der ICAM-1 Expression induziert werden [166]. Auch LPS, das klassischerweise für Toleranzuntersuchungen benutzt wird, zeigt in HUVEC eine reduzierte E-Selektin-Expression nach Vorbehandlung über 4 h und eine deutliche Reduktion einer granulozytären Haftungsfähigkeit unter statischen und auch dynamischen Bedingungen [303]. Eine durch LPS, TNF- $\alpha$  und auch IL-1 induzierte TF-Expression zeigt nach 24 h eine Refraktärität [61]. Eine Aktivierbarkeit im Sinne einer antiinflammatorischen Präkonditionierung nimmt also auch in Endothelzellen nach Exposition mit unterschiedlichen Mediatoren ab. In Analogie mehren sich experimentelle Untersuchungen zu der enormen Adaptationsfähigkeit von Endothelzellen nach Exposition mit unterschiedlichen Stressoren [378]. Über die Bedeutung dieser Schutzsysteme in vivo existieren bisher nur tierexperimentelle

Daten. Intratracheale Injektion lebender *P. aeruginosa* erzeugt auch in Ratten eine Pneumonie und induziert Mukosaschäden im Gastrointestinaltrakt. Eine Vorbehandlung mit i.p. Injektionen von LPS kann diesen Mukosa-Schaden über eine Reduktion der Interaktion zirkulierender Zellen mit mukosalen Endothelien verhindern [341]. Eine LPS-induzierte endotheliale Hyperpermeabilität kann ebenfalls nach Vorbehandlung mit LPS verhindert werden [150].

Faßt man diese Untersuchungen zusammen, so kann auch für Endothelien des Menschen eine Refraktärphase nach Stressexposition postuliert werden. Für den oft prolongierten Verlauf einer Sepsis bei Menschen sollte ein solcher Zustand also ebenfalls möglich sein.

## V. Zusammenfassung und Ausblick

Sowohl die endogene Produktion als auch die exogene Zufuhr von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffderivaten hat weitreichenden Einfluß auf zahlreiche endotheliale Funktionen. Bei toxischen Wirkungen sind kooperative Einflüsse sehr komplex und von den jeweiligen Produktionsraten und Umgebungsbedingungen abhängig. Es scheint bei einer NO<sup>•</sup> induzierten Toxizität eine kooperative Wirkung mit reaktiven Sauerstoffderivaten zu geben, wohingegen eine primär durch reaktive Sauerstoffderivate induzierte Toxizität von niedrig dosiertem NO<sup>•</sup> inhibiert werden kann. Die überwiegende Anzahl der Untersuchungen zeigen eine geringe Potenz zur Induktion von Apoptose, wenn Endothelzellen exogen reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffderivaten ausgesetzt werden. Dagegen scheint die endogene Produktion reaktiver Sauerstoffderivate enger mit proapoptotischen Veränderungen assoziiert zu sein. Die endogene endotheliale Produktion von NO<sup>•</sup> hat in bisherigen Untersuchungen widersprüchliche Bedeutung für die Apoptose und muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Zirkulierende Zellfragmente und auch zirkulierende Endothelzellen konnten bei Menschen unter pathologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Daher liegt die Vermutung nahe, daß diese Zellen entweder aufgrund toxischer Wirkungen abgelöst, oder vermehrt aus dem Knochenmark ausgeschüttet werden [292]. Bisher existieren allerdings keinerlei Daten bei Patienten mit Sepsis, die diese Vermutungen stützen könnten. Eine massive endotheliale Apoptose scheint zumindest postmortal nicht vorhanden zu sein [210]. Die klinische Relevanz dieser Untersuchungen könnte in der pharmakologischen Beeinflussbarkeit der endothelialen Sterbeprozesse liegen. Geht man etwa davon aus, daß ein onkotischer Tod mit mehr inflammatorischen Reaktionen einhergeht, so könnte das Umlenken in Apoptose (z.B. über die Bereitstellung von Energiequellen) antiinflammatorisch wirken. Allerdings weisen andere Modelle auf eine proinflammatorische Rolle der Apoptose unter den Bedingungen von Ischämie und Reperfusion hin [99]. Würde primär eine endotheliale Apoptose bei septischen Patienten vorhanden sein, können durchaus protektive Effekte mit der Inhibition von Apoptose verbunden sein [211].

Unabhängig von toxischen Wirkungen induzieren reaktive Sauerstoff- und auch Stickstoffderivate  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die in Einzelzelluntersuchungen charakterisiert wurden. Nach bisherigen Untersuchungen sind diese Signale mit proinflammatorischen Änderungen von Endothelzellen verbunden (vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und PAI-1, vermehrte Freisetzung von IL-6, IL-8, von-Willebrandt-Faktor und MCP-1).

Konzeptionelle Vorstellungen bei der Pathogenese von vaskulär bedingten Erkrankungen stützen die Vorstellung einer endothelialen Dysproduktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate. So kennt man bei der Pathogenese der Arteriosklerose spezifische Rezeptoren (LOX-1) [415] auf der endothelialen Oberfläche für oxidiertes LDL, das als ein entscheidender Mediator für endotheliale Dysfunktionen bei arteriosklerotischen Patienten angesehen wird [251]. Zumindest in vitro und in tierexperimentellen Studien kann über oxidiertes LDL eine Dysregulation endothelialer Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate nachgezeichnet werden. Kürzlich wurde auch bei Menschen, die eine Punktmutation einer NAD(P)H-Oxidasekomponente aufweisen, gezeigt, daß damit eine erhöhte Arterioskloserie verbunden ist [64]. In Analogie mehren sich die Hinweise bei diabetischer Vasopathie, daß die glukoseinduzierte endotheliale Dysfunktion bei diesen Patienten über endotheliale Produktionsänderungen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate getragen ist [467]. Hyperglykämie kann über die Bildung von AGEs (Advanced Glycation Endproducts) einen spezifischen endothelialen Rezeptor aktivieren (RAGE) [417], der eine Mehrproduktion von reaktiven Sauerstoffderivaten und auch Apoptose in Endothelzellen induzieren kann [118].

Bei septischen Patienten ist in aller Regel ein hohes Maß an Komorbidität vorhanden, die eine endotheliale Dysfunktion erwarten lassen. Endotheliale Dysfunktionen bei septischen Patienten scheinen aufgrund tierexperimenteller Modellvorstellungen naheliegend, sind aber nur ansatzweise belegt. Mediatorkaskaden sind in aller Regel aktiviert (erhöhte Werte zirkulierender proinflammatorischer Zytokine, eine aktivierte plasmatische Gerinnung, u.v.m.) und sollten theoretisch auch endotheliale Funktionen beeinträchtigen. Mit der Aktivierung einer inflammatorischen Reaktion sind systemisch starke antiinflammatorische Reaktionen gekoppelt, die in der Summe die

Aktivierungsfähigkeit zirkulierender Zellen bei septischen Patienten eher herabsetzt. Sogar auf zellulärer Ebene werden parallel mit dem Einschalten von Aktivierungskaskaden auch Inhibitoren aktiviert, die einer unkontrollierten Überaktivierung entgegenwirken [6]. Eine geminderte ex-vivo Aktivierungsfähigkeit ist für Lymphozyten, Neutrophile und vor allem für Monozyten septischer Patienten mehrfach nachgewiesen. Die ursprüngliche Vorstellung einer ausschließlichen Hyperinflammation bei septischen Patienten ist falsch und neuere Arbeiten belegen, daß für Patienten mit Infektionen ein Überwiegen antiinflammatorischer Zytokine prognosebestimmend ist [486, 171]. Ebenso ist die Annahme einer exazerbierten Überstimulation zellulärer Systeme nicht an einfachen klinischen Parametern ablesbar, über die eine Sepsis definiert wird. Diese Erkenntnisse sind wesentliche Bausteine der zahlreichen negativ verlaufenen Studien zur Sepsis [348, 264]. Die klinisch orientierten Definitionen zur Sepsis waren nützlich in epidemiologischen Untersuchungen und genügen nach internationalem Konsens nicht dieser heterogenen Patientenpopulation [2]. So sollten sich zukünftig die Definitionen auf spezifische immunologische oder biochemische Alterationen konzentrieren. Als Konsequenz dieser Überlegungen kann für die extremen Pole der in der vorliegenden Übersicht für experimentelle endotheliale Untersuchungen auf der einen Seite und klinische Studien auf der anderen Seite gefordert werden:

(i) Hyperinflammatorische Reaktionen lassen sich in vitro an Endothelzellen nachzeichnen und belegen eine Dysbalance der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate. Die Wirkung der sehr potenten antiinflammatorischen Reaktionen in vivo ist für Endothelzellen in vitro noch unzureichend untersucht und wird wahrscheinlich auch deren Funktion beeinflussen können. Endogene Schutzsysteme können in Endothelzellen nach subletalem Stress aktiviert werden. Summarisch können diese Befunde also nicht auf die Patientenpopulation mit Sepsis übertragen werden.

(ii) Es ist unklar, welche endothelialen Funktionsdefizite bei septischen gut definierten Patienten überhaupt sicher zu quantifizieren sind, oder wie lange sie anhalten und sich über die Zeit ändern. Auch ist nicht belegt, ob lösliche Marker ein Funktionsdefizit anzeigen, oder lediglich Ausdruck einer allgemeinen Schädigung eines Organismus sind.

(iii) Die Therapie endothelialer Dysfunktionen sollte zur Voraussetzung haben, daß eine quantifizierbare Dysfunktion bei individuellen Patienten auch vorliegt. Eine Dysbalance der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffderivate liegt sehr wahrscheinlich vor.



## VI. Dank

Mein besonderer Dank gilt meinem Lehrer und Mentor, Herrn Professor Dr. Dr. Kox, FRCP, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin am Universitätsklinikum Charité der Humboldt Universität zu Berlin, der mit seinem nahezu unbegrenzten Optimismus immer wieder stimulierend, beratend und kritisch auf meine wissenschaftliche Entwicklung Einfluß genommen hat.

Herrn Professor Dr. Dr. de Groot, Leiter des Instituts für Physiologische Chemie an der Universität Essen, und Frau Priv. Doz. Dr. Rauen danke ich für ihre kompetente Einführung in die „Welt der Radikale“ und die Isolation und Kultur von Endothelzellen.

Desgleichen möchte ich Herrn Professor Dr. Nobiling aus dem Institut für Physiologie der Universität Heidelberg sowie Professor Dr. Mason aus dem Babraham Institute in Cambridge danken, ohne die der Aufbau und die Umsetzung der technisch diffizilen Einzelzelluntersuchungen in dieser Form nicht möglich gewesen wären.

Immer dann, wenn klinische Arbeit mit experimentellen Untersuchungen organisatorisch kollidieren, können solche Klippen mit allen Konsequenzen nie ohne die Unterstützung aller Mitarbeiter der Klinik überstanden werden. Für den Rückhalt und das Ertragen unausgesprochener Mehrbelastung bin ich allen Mitarbeitern unserer Klinik zu Dank verpflichtet. Auch ohne die Einsatzbereitschaft der Doktoranden Dr. Karsten Mäding, Joachim Gerst, Christina Koch, Tanja Mieth und Horst Schuster, mit denen ich zusammenarbeiten konnte, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Desgleichen gilt mein Dank Frau Egerer bei der Hilfe der Zellkultur und den ELISA-Messungen.

Der mir bedeutsamste Dank gilt dem uneingeschränkten Verständnis bei permanentem Verzicht meiner liebevollen Frau.

## VII. Literatur

1. Abello, P.A. Buchman, T.G. Heat shock-induced cell death in murine microvascular endothelial cells depends on priming with tumor necrosis factor-alpha or interferon-gamma. *Shock* 2: 320-323, 1994.
2. Abraham, E., Matthay, M.A., Dinarello, C.A., Vincent, J.L., Cohen, J., Opal, S.M., Glauser, M.P., Parsons, P.E., Fisher-CJ, J. Repine, J.E. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit.Care Med.* 28: 232-235, 2000.
3. Ackermann, E.J., Taylor, J.K., Narayana, R. Bennett, C.F. The role of antiapoptotic Bcl-2 family members in endothelial apoptosis elucidated with antisense oligonucleotides. *J.Biol.Chem.* 274 : 11245-11252, 1999.
4. Ades, E.W., Candal, F.J., Swerlick, R.A., George, V.G., Summers, S., Bosse, D.C. Lawley, T.J. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J.Invest.Dermatol.* 99: 683-690, 1992.
5. Aird, W.C., Edelberg, J.M., Weiler, G.H., Simmons, W.W., Smith, T.W. Rosenberg, R.D. Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J.Cell Biol.* 138: 1117-1124, 1997.
6. Alexander, W.S., Starr, R., Metcalf, D., Nicholson, S.E., Farley, A., Elefanty, A.G., Brysha, M., Kile, B.T., Richardson, R., Baca, M., Zhang, J.G., Willson, T.A., Viney, E.M., Sprigg, N.S., Rakar, S., Corbin, J., Mifsud, S., DiRago, L., Cary, D., Nicola, N.A. Hilton, D.J. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 66: 588-592, 1999.
7. Allport, J.R., Ding, H., Collins, T., Gerritsen, M.E. Luscinskas, F.W. Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J.Exp.Med.* 186: 517-527, 1997.
8. Altura, B.M., Gebrewold, A. Burton, R.W. Failure of microscopic metarterioles to elicit vasodilator responses to acetylcholine, bradykinin, histamine and substance P after ischemic shock, endotoxemia and trauma: possible role of endothelial cells. *Microcirc.Endothelium Lymphatics* 2: 121-127, 1985.
9. Altura, B.M., Gebrewold, A. Burton, R.W. Reactive hyperemic responses of single arterioles are attenuated markedly after intestinal ischemia, endotoxemia and traumatic shock: possible role of endothelial cells. *Microcirc.Endothelium Lymphatics* 2: 3-14, 1985.
10. Andonegui, G., Trevani, A.S., Gamberale, R., Carreras, M.C., Poderoso, J.J., Giordano, M. Geffner, J.R. Effect of nitric oxide donors on oxygen-dependent cytotoxic responses mediated by neutrophils. *J.Immunol.* 162: 2922-2930, 1999.
11. Aoki, N., Siegfried, M. Lefer, A.M. Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries. *Am.J.Physiol.* 256: H1509-H1512, 1989.
12. Arai, T., Kelly, S.A., Brengman, M.L., Takano, M., Smith, E.H., Goldschmidt, C.P. Bulkley, G.B. Ambient but not incremental oxidant generation effects intercellular adhesion molecule 1 induction by tumour necrosis factor alpha in endothelium. *Biochem.J.* 331: 853-861, 1998.
13. Araki, M., Nanri, H., Ejima, K., Murasato, Y., Fujiwara, T., Nakashima, Y. Ikeda, M. Antioxidant function of the mitochondrial protein SP-22 in the cardiovascular system. *J.Biol.Chem.* 274: 2271-2278, 1999.
14. Araki, S., Shimada, Y., Kaji, K. Hayashi, H. Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 168: 1194-1200, 1990.
15. Arnal, J.F., Tack, I., Besombes, J.P., Pipy, B. Negre, S.A. Nitric oxide and superoxide anion production during endothelial cell proliferation. *Am.J.Physiol.* 271: C1521-C1526, 1996.
16. Arnalich, F., Hernanz, A., Jimenez, M., Lopez, J., Tato, E., Vazquez, J.J. Montiel, C. Relationship between circulating levels of calcitonin gene-related peptide, nitric oxide metabolites and hemodynamic changes in human septic shock. *Regul.Pept.* 65: 115-121, 1996.
17. Ashikaga, T., Strada, S.J. Thompson, W.J. Altered expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes during culture of aortic endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 54: 1071-1079, 1997.
18. Aslund, F. Beckwith, J. Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell* 96: 751-753, 1999.
19. Astiz, M.E., DeGent, G.E., Lin, R.Y. Rackow, E.C. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit.Care Med.* 23: 265-271, 1995.

20. Astiz, M.E., Tilly, E., Rackow, E.D. Weil, M.H. Peripheral vascular tone in sepsis. *Chest* 99: 1072-1075, 1991.
21. Augustin, H.G., Kozian, D.H. Johnson, R.C. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16: 901-906, 1994.
22. Austin, R.C., Sood, S.K., Dorward, A.M., Singh, G., Shaughnessy, S.G., Pamidi, S., Outinen, P.A. Weitz, J.I. Homocysteine-dependent alterations in mitochondrial gene expression, function and structure. Homocysteine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> act synergistically to enhance mitochondrial damage. *J.Biol.Chem.* 273: 30808-30817, 1998.
23. Avontuur, J.A., Stam, T.C., Jongen, L.M., van-Amsterdam, J.G., Eggermont, A.M. Bruining, H.A. Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on plasma levels of IL-6, IL-8, TNF alpha and nitrite/nitrate in human septic shock. *Intensive Care Med.* 24: 673-679, 1998.
24. Az, M.T., Saeki, N. Yuge, O. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> movements of endothelial cells exposed to reactive oxygen intermediates: role of hydroxyl radical-mediated redox alteration of cell-membrane Ca<sup>2+</sup> channels. *Br.J.Pharmacol.* 126: 1462-1470, 1999.
25. Azumi, H., Inoue, N., Takeshita, S., Rikitake, Y., Kawashima, S., Hayashi, Y., Itoh, H. Yokoyama, M. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 100: 1494-1498, 1999.
26. Babior, B.M. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93: 1464-1476, 1999.
27. Badrichani, A.Z., Stroka, D.M., Bilbao, G., Curiel, D.T., Bach, F.H. Ferran, C. Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NFkB. *J.Clin.Invest.* 103: 543-553, 1999.
28. Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565-568, 1998.
29. Ballinger, S. W., Patterson, C., Yan, C. N., Doan, R., Burow, D. L., Young, C. G., Yakes, F. M., VanHouten, B., Ballinger, C. A., Freeman, B. A. Runge, M. S. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ.Res* 86, 960-966. 2000.
30. Balzer, M., Lintschinger, B. Groschner, K. Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* 42: 543-549, 1999.
31. Bannerman, D.D., Fitzpatrick, M.J., Anderson, D.Y., Bhattacharjee, A.K., Novitsky, T.J., Hasday, J.D., Cross, A.S. Goldblum, S.E. Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction. *Infect.Immun.* 66: 1400-1407, 1998.
32. Bannerman, D.D., Sathyamoorthy, M. Goldblum, S.E. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J.Biol.Chem.* 273: 35371-35380, 1998.
33. Barbacanne, M.A., Rami, J., Michel, J.B., Souchard, J.P., Philippe, M., Besombes, J.P., Bayard, F. Arnal, J.F. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovasc.Res.* 41: 672-681, 1999.
34. Barchowsky, A., Munro, S.R., Morana, S.J., Vincenti, M.P. Treadwell, M. Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 269: L829-L836, 1995.
35. Bassenge, E. Endothelial function in different organs. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 39: 209-228, 1996.
36. Bastaki, M., Nelli, E.E., Dell'Era, P., Rusnati, M., Molinari, T.M., Parolini, S., Auerbach, R., Ruco, L.P., Possati, L. Presta, M. Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 17: 454-464, 1997.
37. Bayraktutan, U., Draper, N., Lang, D. Shah, A.M. Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* 38: 256-262, 1998.
38. Beauchamp, P., Richard, V., Tamion, F., Lallemand, F., Lebreton, J.P., Vaudry, H., Daveau, M. Thuillez, C. Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. *Circulation* 100: 541-546, 1999.
39. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 1620-1624, 1990.
40. Beckman, J.S. Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am.J.Physiol.* 271: C1424-C1437, 1996.

41. Beltran, B., Orsi, A., Clementi, E. Moncada, S. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *Br.J.Pharmacol.* 129: 953-960, 2000.
42. Berk, B.C. Redox signals that regulate the vascular response to injury. *Thromb.Haemost.* 82: 810-817, 1999.
43. Berkels, R., Suerhoff, S., Roesen, R. Klaus, W. Nitric oxide causes a cGMP-independent intracellular calcium rise in porcine endothelial cells-a paradox. *Microvasc.Res.* 59: 38-44, 2000.
44. Bhagat, K., Moss, R., Collier, J. Vallance, P. Endothelial "stunning" following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc.Res.* 32: 822-829, 1996.
45. Bhagat, K. Vallance, P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 96: 3042-3047, 1997.
46. Bischof, G., Brenman, J., Bredt, D.S. Machen, T.E. Possible regulation of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry into colonic epithelial cells by NO and cGMP. *Cell Calcium* 17: 250-262, 1995.
47. Boldt, J., Papsdorf, M., Kumle, B., Piper, S. Hempelmann, G. Influence of angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat on endothelial-derived substances in the critically ill. *Crit.Care Med.* 26: 1663-1670, 1998.
48. Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J. Cohen, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853, 1994.
49. Bone, H.G., Sielenkamper, A. Booke, M. Sauerstoffangebot in der Sepsis. Seit 10 Jahren mehr Fragen als Antworten. *Anaesthesist.* 48: 63-79, 1999.
50. Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M. Sibbald, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-1655, 1992.
51. Bone, R.C., Grodzin, C.J. Balk, R.A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112: 235-243, 1997.
52. Bortner, C.D., Hughes-FM, J. Cidlowski, J.A. A primary role for  $\text{K}^{+}$  and  $\text{Na}^{+}$  efflux in the activation of apoptosis. *J.Biol.Chem.* 272: 32436-32442, 1997.
53. Bowie, A.G., Moynagh, P.N. O'Neill, L.A.J. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in NF-kappaB activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 272: 25941-25950, 1997.
54. Boyer, C.S., Bannenberg, G.L., Neve, E.P., Ryrfeldt, A. Moldeus, P. Evidence for the activation of the signal-responsive phospholipase A2 by exogenous hydrogen peroxide. *Biochem.Pharmacol.* 50: 753-761, 1995.
55. Bradley, J.R., Johnson, D.R. Pober, J.S. Endothelial activation by hydrogen peroxide. Selective increases of intercellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class I. *Am.J.Pathol.* 142: 1598-1609, 1993.
56. Brigelius-Flohe R., Friedrichs, B., Maurer, S., Schultz, M. Streicher, R. Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem.J.* 328: 199-203, 1997.
57. Britigan, B.E., Rasmussen, G.T. Cox, C.D. Pseudomonas siderophore pyochelin enhances neutrophil-mediated endothelial cell injury. *Am.J.Physiol.* 266: L192-L198, 1994.
58. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 26(S1), 64-74. 2000.
59. Brun-Buisson C., Doyon, F. Carlet, J. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 154: 617-624, 1996.
60. Buchman, T.G., Abello, P.A., Smith, E.H. Bulkley, G.B. Induction of heat shock response leads to apoptosis in endothelial cells previously exposed to endotoxin. *Am.J.Physiol.* 265: H165-H170, 1993.
61. Busso, N., Huet, S., Nicodeme, E., Hiernaux, J. Hyafil, F. Refractory period phenomenon in the induction of tissue factor expression on endothelial cells. *Blood* 78: 2027-2035, 1991.
62. Bychkov, R., Pieper, K., Ried, C., Milosheva, M., Bychkov, E. Haller, H. Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. *Circulation* 99: 1719-1725, 1999.
63. Cadogan, E., Hopkins, N., Giles, S., Bannigan, J.G., Moynihan, J. McLoughlin, P. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase without vasodilator effect in chronically

- infected lungs. *Am.J.Physiol.* 277: L616-L627, 2000.
64. Cahilly, C., Ballantyne, C.M., Lim, D.S., Gotto, A. Marian, A.J. A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ.Res* 86: 391-395, 2000.
  65. Calnek, D.S. Grinnell, B.W. Thrombomodulin-dependent anticoagulant activity is regulated by vascular endothelial growth factor. *Exp.Cell Res.* 238: 294-298, 1998.
  66. Camerer, E., Kolsto, A.B. Prydz, H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb.Res.* 81: 1-41, 1996.
  67. Cameron, E.M., Wang, S.Y., Fink, M.P. Sellke, F.W. Mesenteric and skeletal muscle microvascular responsiveness in subacute sepsis. *Shock* 9: 184-192, 1998.
  68. Campbell, D.L., Stamler, J.S. Strauss, H.C. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J.Gen.Physiol.* 108: 277-293, 1996.
  69. Candeias, L.P., Patel, K.B., Stratford, M.R. Wardman, P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett.* 333: 151-153, 1993.
  70. Canty, T.G., Boyle-EM, J., Farr, A., Morgan, E.N., Verrier, E.D. Pohlman, T.H. Oxidative stress induces NF-kappaB nuclear translocation without degradation of IkappaBalpha. *Circulation* 100: II361-II364, 1999.
  71. Carbajal, J.M. Schaeffer-RC, J. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and genistein differentially modulate protein tyrosine phosphorylation, endothelial morphology, and monolayer barrier function. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 249: 461-466, 1998.
  72. Carr, A. Frei, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13: 1007-1024, 1999.
  73. Ceneviva, G.D., Tzeng, E., Hoyt, D.G., Yee, E., Gallagher, A., Engelhardt, J.F., Kim, Y.M., Billiar, T.R., Watkins, S.A. Pitt, B.R. Nitric oxide inhibits lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 275: L717-L728, 1998.
  74. Cepinskas, G., Lush, C.W. Kvietys, P.R. Anoxia/reoxygenation-induced tolerance with respect to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured endothelial cells. A nuclear factor-kappaB-mediated phenomenon. *Circ.Res* 84: 103-112, 1999.
  75. Chang, J., Rao, N.V., Markewitz, B.A., Hoidal, J.R. Michael, J.R. Nitric oxide donor prevents hydrogen peroxide-mediated endothelial cell injury. *Am.J.Physiol.* 270: L931-40, 1996.
  76. Chaudry, I.H. Sepsis: lessons learned in the last century and future directions. *Arch.Surg.* 134: 922-929, 1999.
  77. Cheng, J.J., Chao, Y.J., Wung, B.S. Wang, D.L. Cyclic strain-induced plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) release from endothelial cells involves reactive oxygen species. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 225: 100-105, 1996.
  78. Cheng, J.J., Wung, B.S., Chao, Y.J. Wang, D.L. Cyclic strain-induced reactive oxygen species involved in ICAM-1 gene induction in endothelial cells. *Hypertension* 31: 125-130, 1998.
  79. Chien, S., Li, S. Shyy, Y.J. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension* 31: 162-169, 1998.
  80. Chiu, J.J., Wung, B.S., Shyy, J.Y., Hsieh, H.J. Wang, D.L. Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17: 3570-3577, 1997.
  81. Choi, W.S., Seo, D.W., Chang, M.S., Han, J.W., Hong, S.Y., Paik, W.K. Lee, H.W. Methylesters of L-arginine and N-nitro-L-arginine induce nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 246: 431-435, 1998.
  82. Christ, F., Gamble, J., Gartside, I.B. Kox, W.J. Increased microvascular water permeability in patients with septic shock, assessed with venous congestion plethysmography (VCP). *Intensive Care Med.* 24: 18-27, 1998.
  83. Chua, C.C., Hamdy, R.C. Chua, B.H. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat heart endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med* 25: 891-897, 1998.
  84. Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M. Stern, D.M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-3561, 1998.
  85. Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley, U., V. Moncada, S. Schapira, A.H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345: 50-54, 1994.

86. Clementi, E., Brown, G.C., Foxwell, N. Moncada, S. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 1559-1562, 1999.
87. Cohen, J. The detection and interpretation of endotoxaemia. *Intensive Care Med.* 26, S51-S56. 2000.
88. Cooper, J.T., Stroka, D.M., Brostjan, C., Palmetshofer, A., Bach, F.H. Ferran, C. A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J.Biol.Chem.* 271: 18068-18073, 1996.
89. Corretti, M.C., Plotnick, G.D. Vogel, R.A. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am.J.Physiol.* 268: H1397-404, 1995.
90. Cosentino, F., Hishikawa, K., Katusic, Z.S. Luscher, T.F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 96: 25-28, 1997.
91. Cosentino, F. Luscher, T.F. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc.Res.* 43: 274-278, 1999.
92. Cotgreave, I.A. Gerdes, R.G. Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 242: 1-9, 1998.
93. Cowley, H.C., Bacon, P.J., Goode, H.F., Webster, N.R., Jones, J.G. Menon, D.K. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit.Care Med.* 24: 1179-1183, 1996.
94. Cullen, V.C., Eustace, N.P. Keenan, A.K. Lack of effect of two nitric oxide donors on hydrogen peroxide-induced endothelial barrier dysfunction. *Biochem.Soc.Trans.* 25: 393, 1997.
95. Cummings, C.J., Sessler, C.N., Beall, L.D., Fisher, B.J., Best, A.M. Fowler, A.A. Soluble E-selectin levels in sepsis and critical illness. Correlation with infection and hemodynamic dysfunction. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 156: 431-437, 1997.
96. Curtis, S.E., Vallet, B., Winn, M.J., Caufield, J.B., King, C.E., Chapler, C.K. Cain, S.M. Role of the vascular endothelium in O<sub>2</sub> extraction during progressive ischemia in canine skeletal muscle. *J.Appl.Physiol.* 79: 1351-1360, 1995.
97. Curzen, N.P., Griffiths, M.J. Evans, T.W. Contraction to endothelin-1 in pulmonary arteries from endotoxin-treated rats is modulated by endothelium. *Am.J.Physiol.* 268: H2260-H2266, 1995.
98. d'Alessio, P., Moutet, M., Coudrier, E., Darquenne, S. Chaudiere, J. ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF-alpha are inhibited by a glutathione peroxidase mimic. *Free Radic.Biol.Med.* 24: 979-987, 1998.
99. Daemen, M.A., Denecker, G., Heemskerk, V.H., Wolfs, T.G., Clauss, M., Vandenabeele, P. Buurman, W.A. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J.Clin.Invest.* 104: 541-549, 1999.
100. De-Keulenaer, G.W., Chappell, D.C., Ishizaka, N., Nerem, R.M., Alexander, R.W. Griendling, K.K. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ.Res.* 82: 1094-1101, 1998.
101. De Frutos, T., de Miguel, L.S., Garcia-Duran, M., Gonzalez-Fernandez, F., Rodriguez-Feo, J.A., Monotn, M., Guerra, J., Farre, J., Casado, S. Lopez-Farre, A. NO from smooth muscle cells decreases NOS expression in endothelial cells: role of TNF-alpha. *Am.J.Physiol.* 277 : H1317-H1325, 1999.
102. Degnim, A.C., Morrow, S.E., Ku, J., Zar, H.A. Nakayama, D.K. Nitric oxide inhibits peroxide-mediated endothelial toxicity. *J.Surg.Res.* 75: 127-134, 1998.
103. Del-Vecchio, P.J., Siflinger, B.A., Belloni, P.N., Holleran, L.A., Lum, H. Malik, A.B. Culture and characterization of pulmonary microvascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 28A: 711-715, 1992.
104. DeMeester, S.L., Qiu, Y., Buchman, T.G., Hotchkiss, R.S., Dunnigan, K., Karl, I.E. Cobb, J.P. Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit.Care Med.* 26: 1500-1509, 1998.
105. Derhaag, J.G., Duijvestijn, A.M., Emeis, J.J., Engels, W. van, B., V. Production and characterization of spontaneous rat heart endothelial cell lines. *Lab.Invest.* 74: 437-451, 1996.
106. Dighiero, P., Behar, C.F., Courtois, Y. Goureau, O. Expression of inducible nitric oxide synthase in bovine corneal endothelial cells and keratocytes in vitro after lipopolysaccharide and cytokines stimulation. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 38: 2045-2052, 1997.
107. Dimmeler, S., Brinkmann, S. Neugebauer, E. Endotoxin-induced changes of endothelial cell

- viability and permeability: protective effect of a 21-aminosteroid. *Eur.J.Pharmacol.* 287: 257-261, 1995.
108. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. Zeiher, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.
  109. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. Zeiher, A.M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J.Exp.Med.* 185: 601-607, 1997.
  110. Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J. Zeiher, A.M. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19: 656-664, 1999.
  111. Dimmeler, S., Rippmann, V., Weiland, U., Haendeler, J. Zeiher, A.M. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ.Res.* 81: 970-976, 1997.
  112. Doan, T.N., Gentry, D.L., Taylor, A.A. Elliott, S.J. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca(2+)-flux pathways in canine venous endothelial cells. *Biochem.J.* 297: 209-215, 1994.
  113. Donadelli, R., Benatti, L., Remuzzi, A., Morigi, M., Gullans, S.R., Benigni, A., Remuzzi, G. Noris, M. Identification of a novel gene--SSK1--in human endothelial cells exposed to shear stress. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 246: 881-887, 1998.
  114. Doughty, L., Carcillo, J.A., Kaplan, S. Janosky, J. Plasma nitrite and nitrate concentrations and multiple organ failure in pediatric sepsis. *Crit.Care Med.* 26: 157-162, 1998.
  115. Drab-Weiss, E.A., Hansra, I.K., Blazek, E.R. Rubin, D.B. Amino thiols protect endothelial cell proliferation against inhibition by lipopolysaccharide. *Shock* 10: 423-429, 1998.
  116. Draijer, R., Vaandrager, A.B., Nolte, C., de-Jonge, H.R., Walter, U. van, H., V. Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ.Res.* 77: 897-905, 1995.
  117. Dreher, D. Junod, A.F. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J.Cell Physiol.* 162: 147-153, 1995.
  118. Du, X., Stockklauser-Färber, K. Rösen, P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic.Biol.Med.* 27: 752-763, 1999.
  119. Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B. Ohshima, H. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol.Life Sci.* 55: 1068-1077, 1999.
  120. Duke, T., South, M. Stewart, A. Activation of the L-arginine nitric oxide pathway in severe sepsis. *Arch.Dis.Child* 76: 203-209, 1997.
  121. Durieu, T.O., Foignat, C.N., Perdomo, J., Gounon, P., Strosberg, A.D. Couraud, P.O. Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 27A: 771-778, 1991.
  122. Duvilanski, B.H., Velardez, M.O., Gonzalez, I.A., Theas, S., Seilicovich, A. Becu, V.D. Nitric oxide donors modify free intracellular calcium levels in rat anterior pituitary cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 146: 19-26, 1998.
  123. Edgell, C.J., McDonald, C.C. Graham, J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80: 3734-3737, 1983.
  124. Egerer, K., Rohr, U., Krausch, D. Kox, W. Die zirkulierenden Adhasionsmolekule sICAM-1 und sE-Selectin bei Patienten mit Sepsis. *Anaesthesist.* 46: 592-598, 1997.
  125. Eiserich, J.P., Hristova, M., Cross, C.E., Jones, A.D., Freeman, B.A., Halliwell, B. van, d., V. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391: 393-397, 1998.
  126. Elliott, S.J. Doan, T.N. Oxidant stress inhibits the store-dependent Ca(2+)-influx pathway of vascular endothelial cells. *Biochem.J.* 292: 385-393, 1993.
  127. Elliott, S.J., Meszaros, J.G. Schilling, W.P. Effect of oxidant stress on calcium signaling in vascular endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med* 13: 635-650, 1992.
  128. Endo, S., Inada, K., Nakae, H., Arakawa, N., Takakuwa, T., Yamada, Y., Shimamura, T., Suzuki, T., Taniguchi, S. Yoshida, M. Nitrite/nitrate oxide (NOx) and cytokine levels in patients with septic shock. *Res.Comm.Mol.Pathol.Pharmacol.* 91: 347-356, 1996.
  129. Endo, S., Inada, K., Nakae, H., Takakuwa, T., Kasai, T., Yamada, Y., Suzuki, T., Taniguchi, S. Yoshida, M. Blood levels of endothelin-1 and thrombomodulin in patients with

- disseminated intravascular coagulation and sepsis. *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* 90: 277-288, 1995.
130. Eppihimer, M.J., Wolitzky, B., Anderson, D.C., Labow, M.A. Granger, D.N. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ.Res.* 79: 560-569, 1996.
  131. Erlich, J., Fearn, C., Mathison, J., Ulevitch, R.J. Mackman, N. Lipopolysaccharide induction of tissue factor expression in rabbits. *Infect.Immun.* 67: 2540-2546, 1999.
  132. Esmon, C.T. Regulation of blood coagulation. *Biochim.Biophys.Acta* 1477, 349-360. 2000.
  133. Essler, M., Hermann, K., Amano, M., Kaibuchi, K., Heesemann, J., Weber, P.C. Aepfelbacher, M. Pasteurella multocida toxin increases endothelial permeability via Rho kinase and myosin light chain phosphatase. *J.Immunol.* 161: 5640-5646, 1998.
  134. Esterbauer, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am.J.Clin.Nutr.* 57: 779S-785S, 1993.
  135. Eu, J.P., Xu, L., Stamler, J.S. Meissner, G. Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species. *Biochem.Pharmacol.* 57: 1079-1084, 1999.
  136. Evans, T., Carpenter, A., Kinderman, H. Cohen, J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ.Shock* 41: 77-81, 1993.
  137. Farias Eisner, R., Chaudhuri, G., Aeberhard, E. Fukuto, J.M. The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide/hydrogen peroxide and the implications to cell resistance/susceptibility. *J.Biol.Chem.* 271: 6144-6151, 1996.
  138. Fasolato, C. Nilius, B. Store depletion triggers the calcium release-activated calcium current (ICRAC) in macrovascular endothelial cells: a comparison with Jurkat and embryonic kidney cell lines. *Pflugers Arch.* 436: 69-74, 1998.
  139. Favre, C.J., Ufret, V.C., Stone, M.R., Ma, H.T. Gill, D.L. Ca<sup>2+</sup> pool emptying stimulates Ca<sup>2+</sup> entry activated by S-nitrosylation. *J.Biol.Chem.* 273: 30855-30858, 1998.
  140. Feelisch, M., Ostrowski, J. Noack, E. On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 14 Suppl 11: Z, 1989.
  141. Ferran, C., Millan, M.T., Csizmadia, V., Cooper, J.T., Brostjan, C., Bach, F.H. Winkler, H. Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 214: 212-223, 1995.
  142. Ferran, C., Stroka, D.M., Badrichani, A.Z., Cooper, J.T., Wrighton, C.J., Soares, M., Grey, S.T. Bach, F.H. A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Blood* 91: 2249-2258, 1998.
  143. Fink, M.P. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol.Scand.Suppl.* 110: 87-95, 1997.
  144. Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J.Leukoc.Biol.* 65: 337-340, 1999.
  145. Fischer, E.H., Charbonneau, H. Tonks, N.K. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 253: 401-406, 1991.
  146. Fontijn, R., Hop, C., Brinkman, H.J., Slater, R., Westerveld, A., van-Mourik, J.A. Pannekoek, H. Maintenance of vascular endothelial cell-specific properties after immortalization with an amphotrophic replication-deficient retrovirus containing human papilloma virus 16 E6/E7 DNA. *Exp.Cell Res.* 216: 199-207, 1995.
  147. Foresti, R., Clark, J.E., Green, C.J. Motterlini, R. Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells. Involvement of superoxide and peroxynitrite anions. *J.Biol.Chem.* 272: 18411-18417, 1997.
  148. Forstermann, U., Boissel, J.P. Kleinert, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 12: 773-790, 1998.
  149. Freyer, D., Manz, R., Ziegenhorn, A., Weih, M., Doecke, W.D., Meisel, A., Schumann, R.R., Schonfelder, G., Dirnagl, U. Weber, J.R. Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of Streptococcus pneumoniae and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J.Immunol.* 163: 4308-4314, 1999.
  150. Fujii, E., Yoshioka, T., Ishida, H., Irie, K. Muraki, T. Evaluation of iNOS-dependent and independent mechanisms of the microvascular permeability change induced by lipopolysaccharide. *Br.J.Pharmacol.* 130(1), 90-94. 2000.
  151. Fukuyama, N., Takebayashi, Y., Hida, M., Ishida, H., Ichimori, K. Nakazawa, H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic.Biol.Med.* 22: 771-774, 1997.
  152. Furchgott, R.F. Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
  153. Galley, H.F., Davies, M.J. Webster, N.R. Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading. *Free Radic.Biol.Med.* 20: 139-143, 1996.
  154. Galley, H.F., Davies, M.J. Webster, N.R. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit.Care Med.* 24: 1649-1653, 1996.



155. Galley, H.F., Howdle, P.D., Walker, B.E. Webster, N.R. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radic.Biol.Med.* 23: 768-774, 1997.
156. Galley, H.F., Nelson, S.J., Dhillon, J., Dubbels, A.M. Webster, N.R. Effect of the nitric oxide inhibitor, L-N(G)-monomethylarginine, on accumulation of interleukin-6 and interleukin-8, and nuclear factor-kappaB activity in a human endothelial cell line. *Crit.Care Med.* 27: 908-912, 1999.
157. Galley, H.F., Walker, B.E., Howdle, P.D. Webster, N.R. Regulation of nitric oxide synthase activity in cultured human endothelial cells: effect of antioxidants. *Free Radic.Biol.Med* 21: 97-101, 1996.
158. Gardinali, M., Padalino, P., Vesconi, S., Calcagno, A., Ciappellano, S., Conciato, L., Chiara, O., Agostoni, A. Nespoli, A. Complement activation and polymorphonuclear neutrophil leukocyte elastase in sepsis. Correlation with severity of disease. *Arch.Surg.* 127: 1219-1224, 1992.
159. Gaynor, E., Bouvier, C. Spaet, T.H. Vascular lesions: possible pathogenetic basis of the generalized Shwartzman reaction. *Science* 170: 986-988, 1970.
160. George, F., Brouqui, P., Boffa, M.C., Mutin, M., Drancourt, M., Brisson, C., Raoult, D. Sampol, J. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood* 82: 2109-2116, 1993.
161. Gericke, M., Droogmans, G. Nilius, B. Thapsigargin discharges intracellular calcium stores and induces transmembrane currents in human endothelial cells. *Pflugers Arch.* 422: 552-557, 1993.
162. Gerritsen, M.E. Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem.Pharmacol.* 36: 2701-2711, 1987.
163. Gerszten, R.E., Garcia, Z.E., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone-MA, J., Luster, A.D., Luscinskas, F.W. Rosenzweig, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718-723, 1999.
164. Ghafourifar, P., Schenk, U., Klein, S.D. Richter, C. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J.Biol.Chem.* 274: 31185-31188, 1999.
165. Gill, R.R., Gbur-CJ, J., Fisher, B.J., Hess, M.L., Fowler, A.A., Kukreja, R.C. Sholley, M.M. Heat shock provides delayed protection against oxidative injury in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 30: 2739-2749, 1998.
166. Ginis, I., Schweizer, U., Brenner, M., Liu, J., Azzam, N., Spatz, M. Hallenbeck, J.M. TNF-alpha pretreatment prevents subsequent activation of cultured brain cells with TNF-alpha and hypoxia via ceramide. *Am.J.Physiol.* 276: C1171-C1183, 1999.
167. Ginsburg, I. Varani, J. Interaction of viable group A streptococci and hydrogen peroxide in killing of vascular endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 14: 495-500, 1993.
168. Gipson, T.S., Bless, N.M., Shanley, T.P., Crouch, L.D., Bleavins, M.R., Younkin, E.M., Sarma, V., Gibbs, D.F., Tefera, W., McConnell, P.C., Mueller, W.T., Johnson, K.J. Ward, P.A. Regulatory effects of endogenous protease inhibitors in acute lung inflammatory injury. *J.Immunol.* 162: 3653-3662, 1999.
169. Gobbel, G.T., Chan, T.Y. Chan, P.H. Nitric oxide- and superoxide-mediated toxicity in cerebral endothelial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 282: 1600-1607, 1997.
170. Goetz, R.M., Thatte, H.S., Prabhakar, P., Cho, M.R., Michel, T. Golan, D.E. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 2788-2793, 1999.
171. Gogos, A.C., Drsou, E., Bassaris, H.P. Skoutelis, A. Pro- versus Anti-inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options. *J.Infect.Dis.* 181: 176-180, 2000.
172. Gomes, L.F., Cuccovia, I.M., Chaimovich, H., Barbieri, D.H. Politi, M.J. Permeation of superoxide anion through the bilayer of vesicles of a synthetic amphiphile. *Biochim.Biophys.Acta* 1152 : 78-82, 1993.
173. Gomez-Jimenez, J., Salgado, A., Mourelle, M., Martin, M.C., Segura, R.M., Peracaula, R. Moncada, S. L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit.Care Med.* 23: 253-258, 1995.
174. Goode, H.F., Cowley, H.C., Walker, B.E., Howdle, P.D. Webster, N.R. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit.Care Med.* 23: 646-651, 1995.
175. Gopalakrishna, R., Chen, Z.H. Gundimeda, U. Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J.Biol.Chem.* 268: 27180-27185, 1993.

176. Gospodarowicz, D., Moran, J., Braun, D. Birdwell, C. Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 73: 4120-4124, 1976.
177. Graier, W.F., Groschner, K., Schmidt, K. Kukovetz, W.R. SK&F 96365 inhibits histamine-induced formation of endothelium-derived relaxing factor in human endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 186: 1539-1545, 1992.
178. Graier, W.F., Hoebel, B.G., Paltauf, D.J. Kostner, G.M. Effects of superoxide anions on endothelial Ca<sup>2+</sup> signaling pathways. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18: 1470-1479, 1998.
179. Graier, W.F., Myers, P.R., Rubin, L.J., Adams, H.R. Parker, J.L. Escherichia coli endotoxin inhibits agonist-mediated cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization and nitric oxide biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circ.Res.* 75: 659-668, 1994.
180. Grau, G.E., de-Moerloose, P., Bulla, O., Lou, J., Lei, Z., Reber, G., Mili, N., Ricou, B., Morel, D.R. Suter, P.M. Haemostatic properties of human pulmonary and cerebral microvascular endothelial cells. *Thromb.Haemost.* 77: 585-590, 1997.
181. Greenwood, J., Pryce, G., Devine, L., Male, D.K., dos, S.W., Calder, V.L. Adamson, P. SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. *J.Neuroimmunol.* 71: 51-63, 1996.
182. Griendling, K.K. Alexander, R.W. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 96: 3264-3265, 1997.
183. Grisham, M.B., Granger, D.N. Lefer, D.J. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic.Biol.Med.* 25: 404-433, 1998.
184. Grisham, M.B., Jour'dheuil, D. Wink, D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am.J.Physiol.* 276: G315-G321, 1999.
185. Groner, W., Winkelman, J.W., Harris, A.G., Ince, C., Bouma, G.J., Messmer, K. Nadeau, R.G. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat.Med.* 5: 1209-1212, 1999.
186. Groschner, K., Graier, W.F. Kukovetz, W.R. Activation of a small-conductance Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channel contributes to bradykinin-induced stimulation of nitric oxide synthesis in pig aortic endothelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1137: 162-170, 1992.
187. Gross, S.S., Jaffe, E.A., Levi, R. Kilbourn, R.G. Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 178: 823-829, 1991.
188. Guittet, O., Roy, B. Lepoivre, M. Nitric oxide: a radical molecule in quest of free radicals in proteins. *Cell Mol.Life Sci.* 55: 1054-1067, 1999.
189. Gupta, M.P., Evanoff, V. Hart, C.M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-mediated injury to porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 272: L1133-L1141, 1997.
190. Haddad, I.Y., Pataki, G., Hu, P., Galliani, C., Beckman, J.S. Matalon, S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J.Clin.Invest.* 94: 2407-2413, 1994.
191. Haendeler, J., Zeiher, A.M. Dimmeler, S. Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. *Eur.J.Pharmacol.* 317: 407-411, 1996.
192. Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Bayoumy, S., Garzotto, M., McLoughlin, M., Gallily, R., Edwards, C.K., Schuchman, E.H., Fuks, Z. Kolesnick, R. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J.Exp.Med.* 186: 1831-1841, 1997.
193. Halliwell, B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.* 411: 157-160, 1997.
194. Hartl, W.H., Gunther, B., Inthorn, D. Heberer, G. Reactive hyperemia in patients with septic conditions. *Surgery* 103: 440-444, 1988.
195. Hauptmann, S., Klosterhalfen, B., Weis, J., Mittermayer, C. Kirkpatrick, C.J. Skeletal muscle oedema and muscle fibre necrosis during septic shock. Observations with a porcine septic shock model. *Virchows Arch* 424: 653-659, 1994.
196. Hauptmann, S., Klosterhalfen, B., Weis, J., Poche, R., Mittermayer, C. Kirkpatrick, C.J. Morphology of cardiac muscle in septic shock. Observations with a porcine septic shock model. *Virchows Arch.* 426: 487-491, 1995.
197. Heffelfinger, S.C., Hawkins, H.H., Barrish, J., Taylor, L. Darlington, G.J. SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 28A: 136-142, 1992.
198. Hempel, S.L., Buettner, G.R., O'Malley, Y.Q., Wessels, D.A. Flaherty, D.M.

- Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic.Biol.Med.* 27: 146-159, 1999.
199. Hensel, M., Volk, T. Kox, W.J. The influence of cellular hypoxia and reactive oxygen species on the development of endothelial cell edema. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 17: 67-74, 1997.
  200. Herbst, U., Toborek, M., Kaiser, S., Mattson, M.P. Hennig, B. 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J.Cell Physiol.* 181: 295-303, 1999.
  201. Hermann, C., Zeiher, A.M. Dimmeler, S. Shear stress inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17: 3588-3592, 1997.
  202. Hiraishi, H., Terano, A., Razandi, M., Pedram, A., Sugimoto, T., Harada, T. Ivey, K.J. Reactive oxygen metabolite-induced toxicity to cultured bovine endothelial cells: status of cellular iron in mediating injury. *J.Cell Physiol.* 160: 132-134, 1994.
  203. Hirokawa, K. Aoki, N. Up-regulation of thrombomodulin in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *J.Biochem.Tokyo.* 108: 839-845, 1990.
  204. Hong, J.E., Santucci, L.A., Tian, X. Silverman, D.J. Superoxide dismutase-dependent, catalase-sensitive peroxides in human endothelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*. *Infect.Immun.* 66: 1293-1298, 1998.
  205. Hong, Y.H., Peng, H.B., La, F., V Liao, J.K. Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulating factor by TGF-beta1. *J.Immunol.* 159: 2418-2423, 1997.
  206. Hoque, A.M., Papapetropoulos, A., Venema, R.C., Catravas, J.D. Fuchs, L.C. Effects of antisense oligonucleotide to iNOS on hemodynamic and vascular changes induced by LPS. *Am.J.Physiol.* 275: H1078-H1083, 1998.
  207. Horton, J.W. Cardiac apoptosis in burn trauma. *Shock* 13: 112, 2000.
  208. Hoshi, H. McKeehan, W.L. Brain- and liver cell-derived factors are required for growth of human endothelial cells in serum-free culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81: 6413-6417, 1984.
  209. Hotchkiss, R.S., Swanson, P.E., Cobb, J.P., Jacobson, A., Buchman, T.G. Karl, I.E. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit.Care Med.* 25: 1298-1307, 1997.
  210. Hotchkiss, R.S., Swanson, P.E., Freeman, B.D., Tinsley, K.W., Cobb, J.P., Buchman, T.G. Karl, I.E. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit.Care Med.* 27: 1230-1251, 1999.
  211. Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Chang, K.C., Cobb, J.P., Buchman, T.G., Korsmeyer, S.J. Karl, I.E. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 14541-14546, 1999.
  212. Howard, A.B., Alexander, R.W., Nerem, R.M., Griendling, K.K. Taylor, W.R. Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 272: C421-C427, 1997.
  213. Hoyer, J., Kohler, R. Distler, A. Mechanosensitive Ca<sup>2+</sup> oscillations and STOC activation in endothelial cells. *FASEB J.* 12: 359-366, 1998.
  214. Hoyt, D.G., Mannix, R.J., Gerritsen, M.E., Watkins, S.C., Lazo, J.S. Pitt, B.R. Integrins inhibit LPS-induced DNA strand breakage in cultured lung endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 270: L689-L694, 1996.
  215. Hoyt, D.G., Mannix, R.J., Rusnak, J.M., Pitt, B.R. Lazo, J.S. Collagen is a survival factor against LPS-induced apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 269: L171-L177, 1995.
  216. Hsieh, H.J., Cheng, C.C., Wu, S.T., Chiu, J.J., Wung, B.S. Wang, D.L. Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J.Cell Physiol.* 175: 156-162, 1998.
  217. Hu, Q., Corda, S., Zweier, J.L., Capogrossi, M.C. Ziegelstein, R.C. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation* 97: 268-275, 1998.
  218. Hu, X., Yee, E., Harlan, J.M., Wong, F. Karsan, A. Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. *Blood* 92: 2759-2765, 1998.
  219. Huang, T.Y., Chu, T.F., Chen, H.I. Jen, C.J. Heterogeneity of [Ca(2+)](i) signaling in intact rat aortic endothelium. *FASEB J.* 14: 797-804, 2000.
  220. Huie, R.E. Padmaja, S. The reaction of no with superoxide. *Free Radic.Res.Comm.* 18: 195-199, 1993.
  221. Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Halsey-WA, J., Schraufstatter, I.U., Sauerheber, R.D., Spragg,

- R.G., Jackson, J.H. Cochrane, C.G. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* 263: 1665-1675, 1988.
222. Iba, T., Yagi, Y., Kidokoro, A., Fukunaga, M. Increased plasma levels of soluble thrombomodulin in patients with sepsis and organ failure. *Surg.Today* 25: 585-590, 1995.
  223. Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Utsumi, H., Kang, D., Hattori, N., Uchida, K., Arimura, K., Egashira, K. Takeshita, A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ.Res.* 85: 357-363, 1999.
  224. Igarashi, J., Thatte, H.S., Prabhakar, N.R., Golan, D.E. Michel, T. Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 12583-12588, 1999.
  225. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84: 9265-9269, 1987.
  226. Ince, C. Sinaasappel, M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit.Care Med.* 27: 1369-1377, 1999.
  227. Ioannidis, I., Batz, M., Kirsch, M., Korth, H.G., Sustmann, R. De Groot, H. Low toxicity of nitric oxide against endothelial cells under physiological oxygen partial pressures. *Biochem.J.* 329: 425-430, 1998.
  228. Ioannidis, I., Batz, M., Paul, T., Korth, H.G., Sustmann, R. de-Groot, H. Enhanced release of nitric oxide causes increased cytotoxicity of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and sodium nitroprusside under hypoxic conditions. *Biochem.J.* 318: 789-795, 1996.
  229. Ioannidis, I., Volk, T. De Groot, H. Cytotoxicity of nitric oxide and hydrogen peroxide: is there a cooperative action? *Adv.Exp.Med.Biol.* 387: 25-30, 1996.
  230. Irani, K. Goldschmidt, C.P. Ras, superoxide and signal transduction. *Biochem.Pharmacol.* 55: 1339-1346, 1998.
  231. Irokawa, M., Nishinaga, M., Ikeda, U., Shinoda, Y., Suematsu, M., Gouda, N., Ishimura, Y. Shimada, K. Endothelial-derived nitric oxide preserves anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 135: 9-17, 1997.
  232. Ishihara, H., Matsui, A., Muraoka, M., Tanabe, T., Tsubo, T. Matsuki, A. Detection of capillary protein leakage by indocyanine green and glucose dilutions in septic patients. *Crit.Care Med.* 28: 620-626, 2000.
  233. Ito, A., Tsao, P.S., Adimoolam, S., Kimoto, M., Ogawa, T. Cooke, J.P. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 99: 3092-3095, 1999.
  234. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. Minick, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest.* 52: 2745-2756, 1973.
  235. Jones, S.A., O'Donnell, V.B., Wood, J.D., Broughton, J.P., Hughes, E.J. Jones, O.T. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 271: H1626-H1634, 1996.
  236. Jornot, L., Petersen, H. Junod, A.F. Modulation of the DNA binding activity of transcription factors CREP, NFkappaB and HSF by H2O2 and TNF alpha. Differences between in vivo and in vitro effects. *FEBS Lett.* 416: 381-386, 1997.
  237. Joshi, M.S., Ponthier, J.L. Lancaster-JR, J. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic.Biol.Med.* 27: 1357-1366, 1999.
  238. Kadletz, M., Dignan, R.J., Mullen, P.G., Windsor, A.C., Sugerman, H.J. Wechsler, A.S. Pulmonary artery endothelial cell function in swine pseudomonas sepsis. *J.Surg.Res.* 60: 186-192, 1996.
  239. Kaku, Y., Nanri, H., Sakimura, T., Ejima, K., Kuroiwa, A. Ikeda, M. Differential induction of constitutive and inducible nitric oxide synthases by distinct inflammatory stimuli in bovine aortic endothelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1356: 43-52, 1997.
  240. Kamata, H. Hirata, H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 11: 1-14, 1999.
  241. Kanai, A.J., Strauss, H.C., Truskey, G.A., Crews, A.L., Grunfeld, S. Malinski, T. Shear stress induces ATP-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells, measured directly with a porphyrinic microsensor. *Circ.Res.* 77: 284-293, 1995.
  242. Kayal, S., Jais, J.P., Aguiuni, N., Chaudiere, J. Labrousse, J. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 157: 776-784, 1998.
  243. Kelm, M., Feelisch, M., Spahr, R., Piper, H.M., Noack, E. Schrader, J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells.

- Biochem.Biophys.Res.Comm. 154: 236-244, 1988.
244. Kessler, P., Popp, R., Busse, R. Schini, K., V. Proinflammatory mediators chronically downregulate the formation of the endothelium-derived hyperpolarizing factor in arteries via a nitric oxide/cyclic GMP-dependent mechanism. *Circulation* 99: 1878-1884, 1999.
  245. Khan, B.V., Harrison, D.G., Olbrych, M.T., Alexander, R.W. Medford, R.M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 9114-9119, 1996.
  246. Kim, W.K., Choi, Y.B., Rayudu, P.V., Das, P., Asaad, W., Stamler, J.S. Lipton, S.A. Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO<sup>-</sup>. *Neuron* 24: 461-469, 1999.
  247. Kimura, C., Oike, M. Ito, Y. Acute glucose overload abolishes Ca<sup>2+</sup> oscillation in cultured endothelial cells from bovine aorta: a possible role of superoxide anion. *Circ.Res.* 82: 677-685, 1998.
  248. Kinnula, V.L., Everitt, J.I., Whorton, A.R. Crapo, J.D. Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 261: L84-L91, 1991.
  249. Kirinaka, H., Miyake, K. Iijima, S. Isolation of immortal human endothelial cells. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 59: 912-914, 1995.
  250. Kirsch, M. De Groot, H. Reaction of peroxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, the formation of hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* 274: 24664-24670, 1999.
  251. Kita, T. LOX-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis. *Circ.Res.* 84: 1113-1115, 1999.
  252. Klatt, P., Molina, E.P., De-Lacoba, M.G., Padilla, C.A., Martinez, G.E., Barcena, J.A. Lamas, S. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J.* 13: 1481-1490, 1999.
  253. Koedel, U. Pfister, H.W. Superoxide production by primary rat cerebral endothelial cells in response to pneumococci. *J.Neuroimmunol.* 96: 190-200, 1999.
  254. Koga, S., Morris, S., Ogawa, S., Liao, H., Bilezikian, J.P., Chen, G., Thompson, W.J., Ashikaga, T., Brett, J., Stern, D.M. TNF modulates endothelial properties by decreasing cAMP. *Am.J.Physiol.* 268: C1104-C1113, 1995.
  255. Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. Nagano, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal.Chem.* 70: 2446-2453, 1998.
  256. Koliwad, S.K., Kunze, D.L. Elliott, S.J. Oxidant stress activates a non-selective cation channel responsible for membrane depolarization in calf vascular endothelial cells. *J.Physiol.Lond.* 491: 1-12, 1996.
  257. Komalavilas, P. Lincoln, T.M. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J.Biol.Chem.* 271: 21933-21938, 1996.
  258. Kong, S.K., Choy, Y.M. Lee, C.Y. The nitric oxide donor, sodium nitroprusside, increased intranuclear and cytosolic free calcium concentration in single PU5-1.8 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 199: 234-240, 1994.
  259. Kooy, N.W., Lewis, S.J., Royall, J.A., Ye, Y.Z., Kelly, D.R. Beckman, J.S. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit.Care Med.* 25: 812-819, 1997.
  260. Kooy, N.W. Royall, J.A. Agonist-induced peroxynitrite production from endothelial cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 310: 352-359, 1994.
  261. Kooy, N.W., Royall, J.A., Ye, Y.Z., Kelly, D.R. Beckman, J.S. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 151: 1250-1254, 1995.
  262. Koppenol, W.H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic.Biol.Med.* 25: 385-391, 1998.
  263. Kotsonis, P., Frey, A., Frohlich, L.G., Hofmann, H., Reif, A., Wink, D.A., Feelisch, M. Schmidt, H.H. Autoinhibition of neuronal nitric oxide synthase: distinct effects of reactive nitrogen and oxygen species on enzyme activity. *Biochem.J.* 340: 745-752, 1999.
  264. Kox, W.J., Volk, T., Kox, S.N. Volk, H.D. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.* 26: S124-S128, 2000.
  265. Krafte, J.B. Brilli, R. Increased circulating thrombomodulin in children with septic shock. *Crit.Care Med.* 26: 933-938, 1998.
  266. Krafte, J.B., Brilli, R., Szabo, C., Denenberg, A., Moore, L. Salzman, A.L. Circulating methemoglobin and nitrite/nitrate concentrations as indicators of nitric oxide overproduction

- in critically ill children with septic shock. *Crit.Care Med.* 25: 1588-1593, 1997.
267. Kristof, A.S., Noorhosseini, H. Hussain, S.N. Attenuation of endothelium-dependent hyperpolarizing factor by bacterial lipopolysaccharides. *Eur.J.Pharmacol.* 328: 69-73, 1997.
  268. Kroemer, G., Dallaporta, B. Resche, R.M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu.Rev.Physiol.* 60: 619-642, 1998.
  269. Kroll, J. Waltenberger, J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Bioch.Biophys.Res.Comm.* 265: 636-639, 1999.
  270. Kuchan, M.J., Jo, H. Frangos, J.A. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 267: C753-8, 1994.
  271. Kuo, L., Chilian, W.M., Davis, M.J. Laughlin, M.H. Endotoxin impairs flow-induced vasodilation of porcine coronary arterioles. *Am.J.Physiol.* 262: H1838-H1845, 1992.
  272. Kurosawa, S., Stearns, K.D., Carson, C.W., D'Angelo, A., Della, V.P. Esmon, C.T. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood* 91: 725-727, 1998.
  273. Lakshminarayanan, V., Beno, D.W., Costa, R.H. Roebuck, K.A. Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor- $\alpha$  in endothelial and epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 272: 32910-32918, 1997.
  274. Lakshminarayanan, V., Drab, W.E. Roebuck, K.A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor- $\alpha$  induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 273: 32670-32678, 1998.
  275. Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P. Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 6348-6352, 1992.
  276. Lancaster-JR, J. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91: 8137-8141, 1994.
  277. Lander, H.M., Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Mirza, U.A., Chait, B.T., Campbell, S. Quilliam, L.A. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J.Biol.Chem.* 272: 4323-4326, 1997.
  278. Lang, D., Bell, J.P., Bayraktutan, U., Small, G.R., Shah, A.M. Lewis, M.J. Phenotypic changes in rat and guinea pig coronary microvascular endothelium after culture: loss of nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc.Res* 42: 794-804, 1999.
  279. Langille, B.L. O'Donnell, F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 231: 405-407, 1986.
  280. Lantoin, F., Iouzalen, L., Devynck, M.A., Millanvoeye-van, B.E. David, D.M. Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem.J.* 330: 695-699, 1998.
  281. Lawson, J.A., Rokach, J. FitzGerald, G.A. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J.Biol.Chem.* 274: 24441-24444, 1999.
  282. Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kuhnle, S. Nicotera, P. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp.Cell Res.* 249: 396-403, 1999.
  283. Lelli-JL, J., Becks, L.L., Dabrowska, M.I. Hinshaw, D.B. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med* 25: 694-702, 1998.
  284. Lennon, P.F., Taylor, C.T., Stahl, G.L. Colgan, S.P. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J.Exp.Med.* 188: 1433-1443, 1998.
  285. Levin, S. Apoptosis, necrosis, or oncosis: what is your diagnosis? A report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol.Sci.* 41: 155-156, 1998.
  286. Levin, S., Bucci, T.J., Cohen, S.M., Fix, A.S., Hardisty, J.F., LeGrand, E.K., Maronpot, R.R. Trump, B.F. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol.Pathol.* 27: 484-490, 1999.
  287. Lewis, L.J., Hoak, J.C., Maca, R.D. Fry, G.L. Replication of human endothelial cells in culture. *Science* 181: 453-454, 1973.
  288. Lewis, M.S., Whatley, R.E., Cain, P., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. Zimmerman, G.A. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J.Clin.Invest.* 82: 2045-2055, 1988.
  289. Li, A.E., Ito, H., Rovira, I.I., Kim, K.S., Takeda, K., Yu, Z.Y., Ferrans, V.J. Finkel, T. A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ.Res.* 85: 304-310, 1999.

290. Li, D., Yang, B. Mehta, J.L. Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances hypoxia-reoxygenation-mediated apoptosis in cultured human coronary artery endothelial cells: critical role of protein kinase C. *Cardiovasc.Res.* 42: 805-813, 1999.
291. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489, 1997.
292. Lin, Y., Hebbel, R.P. Solovey, A. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J.Clin.Invest.* 105: 71-77, 2000.
293. Lindner, H., Behrends, U., Misumi, Y., Kremmer, E., Eissner, G. Schultz, H.S. Loss of myocardial capillary endothelial-cell alkaline phosphatase (ALP) activity in primary endothelial cell culture. *Cell Tissue Res.* 291: 497-505, 1998.
294. Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. Stamler, J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632, 1993.
295. Liu, X., Miller, M.J.S., Joshi, M.S., Thomas, D.D. Lancaster-JR, J. Accelerated reaction of nitric oxide with O<sub>2</sub> within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95: 2175-2179, 1998.
296. Loke, K.E., McConnell, P.I., Tuzman, J.M., Shesely, E.G., Smith, C.J., Stackpole, C.J., Thompson, C.I., Kaley, G., Wolin, M.S. Hintze, T.H. Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circ.Res.* 84: 840-845, 1999.
297. Lopez-Aguirre, Y. Paramo, J.A. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. *Thromb.Res* 94: 95-101, 1999.
298. Lopez-Collazo, E., Mateo, J., Miras, P.M. Bosca, L. Requirement of nitric oxide and calcium mobilization for the induction of apoptosis in adrenal vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 413: 124-128, 1997.
299. Lopez-Ongil, S., Torrecillas, G., Perez-Sala, D., Gonzalez-Santiago, L., Rodriguez-Puyol, M. Rodriguez-Puyol, D. Mechanisms involved in the contraction of endothelial cells by hydrogen peroxide. *Free Radic.Biol.Med* 26: 501-510, 1999.
300. Lopez, O.S., Hernandez, P.O., Navarro, A.J., Perez-de, L.G., Rodriguez, P.M., Lamas, S. Rodriguez, P.D. Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* 124: 447-454, 1998.
301. Lorenz, B., Schluter, T., Bohnensack, R., Pergande, G. Muller, W.E. Effect of flupirtine on cell death of human umbilical vein endothelial cells induced by reactive oxygen species. *Biochem.Pharmacol.* 56: 1615-1624, 1998.
302. Lucas, R., Garcia, I., Donati, Y.R., Hribar, M., Mandriota, S.J., Giroud, C., Buurman, W.A., Franssen, L., Suter, P.M., Nunez, G., Pepper, M.S. Grau, G.E. Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 28: 3577-3586, 1998.
303. Lush, C.W., Cepinskas, G. Kvietys, P.R. LPS tolerance in human endothelial cells: reduced PMN adhesion, E-selectin expression, and NF- $\kappa$ B mobilization. *Am.J.Physiol.* 278: H853-H861, 2000.
304. Lynch, R.E. Fridovich, I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J.Biol.Chem.* 253: 4697-4699, 1978.
305. Ma, X.L., Gao, F., Liu, G.L., Lopez, B.L., Christopher, T.A., Fukuto, J.M., Wink, D.A. Feelisch, M. Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 14617-14622, 1999.
306. Maier, J.A., Morelli, D. Balsari, A. The differential response to interferon gamma by normal and transformed endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 214: 582-588, 1995.
307. Majno, G. Joris, I. Commentary: on the misuse of the term "necrosis": a step in the right direction. *Toxicol.Pathol.* 27: 494, 1999.
308. Malinski, T. Taha, Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 358: 676-678, 1992.
309. Malinski, T., Taha, Z., Grunfeld, S., Patton, S., Kapturczak, M. Tombouliau, P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 193: 1076-1082, 1993.
310. Matsubara, T. Ziff, M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J.Immunol.* 137: 3295-3298, 1986.
311. Matsumoto, H., Ueshima, S., Fukao, H., Mitsui, Y. Matsuo, O. Identification of urokinase-type plasminogen activator receptor in human endothelial cells and its modulation by phorbol myristate acetate. *Cell Struct.Funct.* 20: 429-437, 1995.

312. Mavrommatis, A.C., Theodoridis, T., Orfanidou, A., Roussos, C., Christopoulou, K., V Zakynthinos, S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit.Care Med.* 28: 451-457, 2000.
313. McCord, J.M. Fridovich, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J.Biol.Chem.* 244: 6056-6063, 1969.
314. McGill, S.N., Ahmed, N.A. Christou, N.V. Increased plasma von Willebrand factor in the systemic inflammatory response syndrome is derived from generalized endothelial cell activation. *Crit.Care Med.* 26: 296-300, 1998.
315. McIntyre, M., Bohr, D.F. Dominiczak, A.F. Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. *Hypertension* 34: 539-545, 1999.
316. McKenna, R., Laskey, R.E., Wang, Y., Jaeschke, H. Mathews, W.R. Effect of endotoxin-enhanced hepatic reperfusion injury on endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Shock* 6: 106-111, 1996.
317. McKenna, T.M., Martin, F.M., Chernow, B. Briglia, F.A. Vascular endothelium contributes to decreased aortic contractility in experimental sepsis. *Circ.Shock* 19: 267-273, 1986.
318. McQuaid, K.E., Smyth, E.M. Keenan, A.K. Evidence for modulation of hydrogen peroxide-induced endothelial barrier dysfunction by nitric oxide in vitro. *Eur.J.Pharmacol.* 307: 233-241, 1996.
319. Messmer, U.K., Winkel, G., Briner, V.A. Pfeilschifter, J. Glucocorticoids potently block tumour necrosis factor-alpha- and lipopolysaccharide-induced apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells upstream of caspase 3 activation. *Br.J.Pharmacol.* 127: 1633-1640, 1999.
320. Meszaros, L.G., Bak, J. Chu, A. Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature* 364: 76-79, 1993.
321. Moldovan, F., Benanni, H., Fiet, J., Cussenot, O., Dumas, J., Darbord, C. Soliman, H.R. Establishment of permanent human endothelial cells achieved by transfection with SV40 large T antigen that retain typical phenotypical and functional characteristics. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.* 32: 16-23, 1996.
322. Moldovan, L., Moldovan, N.I., Sohn, R.H., Parikh, S.A. Goldschmidt-Clermont, P.J. Redox Changes of Cultured Endothelial Cells and Actin Dynamics. *Circ.Res.* 86: 549-557, 2000.
323. Moore, T.M., Chetham, P.M., Kelly, J.J. Stevens, T. Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP. *Am.J.Physiol.* 275: L203-L222, 1998.
324. Morrison, A.M., Wang, P. Chaudry, I.H. A novel nonanticoagulant heparin prevents vascular endothelial cell dysfunction during hyperdynamic sepsis. *Shock* 6: 46-51, 1996.
325. Moss, M., Gillespie, M.K., Ackerson, L., Moore, F.A., Moore, E.E. Parsons, P.E. Endothelial cell activity varies in patients at risk for the adult respiratory distress syndrome. *Crit.Care Med.* 24: 1782-1786, 1996.
326. Motterlini, R., Foresti, R., Intaglietta, M. Winslow, R.M. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am.J.Physiol.* 270: H107-H114, 1996.
327. Moutet, M., d'Alessio, P., Malette, P., Devaux, V. Chaudiere, J. Glutathione peroxidase mimics prevent TNFalpha- and neutrophil-induced endothelial alterations. *Free Radic.Biol.Med.* 25: 270-281, 1998.
328. Muhl, H., Sandau, K., Brune, B., Briner, V.A. Pfeilschifter, J. Nitric oxide donors induce apoptosis in glomerular mesangial cells, epithelial cells and endothelial cells. *Eur.J.Pharmacol.* 317: 137-149, 1996.
329. Muller, J.M., Davis, M.J., Kuo, L. Chilian, W.M. Changes in coronary endothelial cell Ca<sup>2+</sup> concentration during shear stress- and agonist-induced vasodilation. *Am.J.Physiol.* 276: H1706-H1714, 1999.
330. Munzel, T., Li, H., Mollnau, H., Hink, U., Matheis, E., Hartmann, M., Oelze, M., Skatchkov, M., Warnholtz, A., Duncker, L. Forstermann, U. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ.Res.* 86: E7-E12, 2000.
331. Murohara, T., Scalia, R. Lefer, A.M. Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells. Possible involvement of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors. *Circ.Res.* 78: 780-789, 1996.
332. Murphy, H.S., Shayman, J.A., Till, G.O., Mahrougui, M., Owens, C.B., Ryan, U.S. Ward, P.A. Superoxide responses of endothelial cells to C5a and TNF-alpha: divergent signal transduction pathways. *Am.J.Physiol.* 263: L51-59, 1992.
333. Murphy, H.S., Warner, R.L., Bakopoulos, N., Dame, M.K., Varani, J. Ward, P.A.



- Endothelial cell determinants of susceptibility to neutrophil-mediated killing. *Shock* 12: 111-117, 1999.
334. Murphy, M.E., Piper, H.M., Watanabe, H., Sies, H. Nitric oxide production by cultured aortic endothelial cells in response to thiol depletion and replenishment. *J.Biol.Chem.* 266: 19378-19383, 1991.
  335. Myers, P.R., Zhong, Q., Jones, J.J., Tanner, M.A., Adams, H.R. Parker, J.L. Release of EDRF and NO in ex vivo perfused aorta: inhibition by in vivo E. coli endotoxemia. *Am.J.Physiol.* 268: H955-H961, 1995.
  336. Nagel, T., Resnick, N., Dewey-CF, J. Gimbrone-MA, J. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 19: 1825-1834, 1999.
  337. Nakatsubo, N., Kojima, H., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Maeda, D., Imai, Y., Irimura, T. Nagano, T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 427: 263-266, 1998.
  338. Nappi, A.J. Vass, E. Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Biochim.Biophys.Acta* 1380: 55-63, 1998.
  339. Narula, P., Xu, J., Kazzaz, J.A., Robbins, C.G., Davis, J.M. Horowitz, S. Synergistic cytotoxicity from nitric oxide and hyperoxia in cultured lung cells. *Am.J.Physiol.* 274: L411-L416, 1998.
  340. Natarajan, V. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J.Lab.Clin.Med* 125: 26-37, 1995.
  341. Nevieri, R.R., Pitt, H.M., Piper, R.D., Sibbald, W.J. Potter, R.F. Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats. *Am.J.Physiol.* 276: G933-G940, 1999.
  342. Niebauer, J., Dulak, J., Chan, J.R., Tsao, P.S. Cooke, J.P. Gene transfer of nitric oxide synthase: effects on endothelial biology. *J.Am.Coll.Cardiol.* 34: 1201-1207, 1999.
  343. Nilius, B., Viana, F. Droogmans, G. Ion channels in vascular endothelium. *Annu.Rev.Physiol.* 59: 145-170, 1997.
  344. Nishida, K., Harrison, D.G., Navas, J.P., Fisher, A.A., Dockery, S.P., Uematsu, M., Nerem, R.M., Alexander, R.W. Murphy, T.J. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J.Clin.Invest.* 90: 2092-2096, 1992.
  345. Nobiling, R., Bührle, C.P. A microscope fluorimeter using multiple-wavelength excitation for ultrasensitive single-cell emission spectrometry. *J.Microsc.* 156, 149-161. 1989.
  346. Noris, M., Morigi, M., Donadelli, R., Aiello, S., Foppolo, M., Todeschini, M., Orisio, S., Remuzzi, G. Remuzzi, A. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ.Res.* 76: 536-543, 1995.
  347. O'Donnell, V. Burkitt, M.J. Mitochondrial metabolism of a hydroperoxide to free radicals in human endothelial cells: an electron spin resonance spin-trapping investigation. *Biochem.J.* 304: 707-713, 1994.
  348. O'Reilly, M., Newcomb, D.E. Remick, D. Endotoxin, sepsis, and the primrose path. *Shock* 12: 411-420, 1999.
  349. Ochoa, J.B., Udekwu, A.O., Billiar, T.R., Curran, R.D., Cerra, F.B., Simmons, R.L. Peitzman, A.B. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann.Surg.* 214: 621-626, 1991.
  350. Okada, H., Woodcock, M.J., Mitchell, J., Sakamoto, T., Marutsuka, K., Sobel, B.E. Fujii, S. Induction of plasminogen activator inhibitor type 1 and type 1 collagen expression in rat cardiac microvascular endothelial cells by interleukin-1 and its dependence on oxygen-centered free radicals. *Circulation* 97: 2175-2182, 1998.
  351. Okayama, N., Grisham, M.B., Kevil, C.G., Eppihimer, L.A., Wink, D.A. Alexander, J.S. Effect of reactive oxygen metabolites on endothelial permeability: role of nitric oxide and iron. *Microcirculation* 6: 107-116, 1999.
  352. Okayama, N., Kevil, C.G., Correia, L., Jourdeuil, D., Itoh, M., Grisham, M.B. Alexander, J.S. Nitric oxide enhances hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability in vitro. *Am.J.Physiol.* 273: C1581-C1587, 1997.
  353. Olesen, S.P., Clapham, D.E. Davies, P.F. Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Nature* 331: 168-170, 1988.
  354. Olofsson, A.M., Vestberg, M., Herwald, H., Rygaard, J., David, G., Arfors, K.E., Linde, V., Flodgaard, H., Dedio, J., Muller-Esterl, W. Lundgren-Akerlund, E. Heparin-binding protein targeted to mitochondrial compartments protects endothelial cells from apoptosis. *J.Clin.Invest.* 104: 885-894, 1999.

355. Onda, M., Toba, M., Andoh, T. Shirota, A. Ultrastructural studies of experimental endotoxin shock in the liver and spleen: therapeutic effects of low-dose heparin on reticuloendothelial disturbances. *Circ.Shock* 18: 11-19, 1986.
356. Opal, S.M. Cohen, J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit.Care Med.* 27: 1608-1616, 1999.
357. Osterud, B., Bajaj, M.S. Bajaj, S.P. Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. On behalf of the Subcommittee on Tissue factor Pathway Inhibitor (TFPI) of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb.Haemost.* 73: 873-875, 1995.
358. Oswald, I.P., Eltoun, I., Wynn, T.A., Schwartz, B., Caspar, P., Paulin, D., Sher, A. James, S.L. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91: 999-1003, 1994.
359. Palmer, R.M., Ferrige, A.G. Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
360. Paltauf, D.J., Posch, K., Paltauf, G. Graier, W.F. Stealth ryanodine-sensitive  $Ca^{2+}$  release contributes to activity of capacitative  $Ca^{2+}$  entry and nitric oxide synthase in bovine endothelial cells. *J.Physiol.Lond.* 513: 369-379, 1998.
361. Pammer, J., Weninger, W., Ban, J., Wojta, J. Tschachler, E. The cell death regulatory protein bak is expressed in endothelial cells in inflamed tissues and is induced by IFN-gamma in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 264: 139-143, 1999.
362. Panes, J., Perry, M.A., Anderson, D.C., Manning, A., Leone, B., Cepinskas, G., Rosenbloom, C.L., Miyasaka, M., Kvietys, P.R. Granger, D.N. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am.J.Physiol.* 269: H1955-H1964, 1995.
363. Panus, P.C., Radi, R., Chumley, P.H., Lillard, R.H. Freeman, B.A. Detection of  $H_2O_2$  release from vascular endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 14: 217-223, 1993.
364. Parker, J.L. Adams, H.R. Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by *Escherichia coli* endotoxemia. *Circ.Res.* 72: 539-551, 1993.
365. Parker, J.L., Keller, R.S., DeFily, D.V., Laughlin, M.H., Novotny, M.J. Adams, H.R. Coronary vascular smooth muscle function in *E. coli* endotoxemia in dogs. *Am.J.Physiol.* 260: H832-H841, 1991.
366. Parker, J.L., Myers, P.R., Zhong, Q., Kim, K. Adams, H.R. Inhibition of endothelium-dependent vasodilation by *Escherichia coli* endotoxemia. *Shock* 2: 451-458, 1994.
367. Parness, J. Palnitkar, S.S. Identification of dantrolene binding sites in porcine skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 270: 18465-18472, 1995.
368. Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A. Darley, U., V. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim.Biophys.Acta* 1411: 385-400, 1999.
369. Peng, H.B., Spiecker, M. Liao, J.K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. *J.Immunol.* 161: 1970-1976, 1998.
370. Peterson, T.E., Poppa, V., Ueba, H., Wu, A., Yan, C. Berk, B.C. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ.Res.* 85: 29-37, 1999.
371. Petrat, F., de-Groot, H. Rauen, U. Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy. *Arch Biochem Biophys* 376: 74-81, 2000.
372. Petzelbauer, P., Bender, J.R., Wilson, J. Pober, J.S. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J.Immunol.* 151: 5062-5072, 1993.
373. Peunova, N. Enikolopov, G. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 364: 450-453, 1993.
374. Pfeiffer, S., Gorren, A.C.F., Schmidt, K., Werner, E.R., Hansert, B., Bohle, D.S. Mayer, B. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J.Biol.Chem.* 272: 3465-3470, 1997.
375. Pfeiffer, S. Mayer, B. Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological pH. *J.Biol.Chem.* 273: 27280-27285, 1998.
376. Pober, J.S. Cotran, R.S. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol.Rev.* 70: 427-451, 1990.
377. Pohlman, T.H. Harlan, J.M. Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell Immunol.* 119: 41-52, 1989.
378. Pohlman, T.H. Harlan, J.M. Adaptive responses of the endothelium to stress. *J.Surg.Res.* 89: 85-119, 2000.

379. Pollard. (4, 670, 394)US. Patent, 1999.
380. Polte, T., Oberle, S. Schroder, H. The nitric oxide donor SIN-1 protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible role for cyclic GMP and heme oxygenase. *J.Mol.Cell Cardiol.* 29: 3305-3310, 1997.
381. Pou, S., Pou, W.S., Bredt, D.S., Snyder, S.H. Rosen, G.M. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem.* 267: 24173-24176, 1992.
382. Prasad, A.R., Logan, S.A., Nerem, R.M., Schwartz, C.J. Sprague, E.A. Flow-related responses of intracellular inositol phosphate levels in cultured aortic endothelial cells. *Circ.Res.* 72: 827-836, 1993.
383. Privat, C., Lantoine, F., Bedioui, F., Millanvoe-van, B.E., Devynck, J. Devynck, M.A. Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of three methods of quantification. *Life Sci.* 61: 1193-1202, 1997.
384. Privat, C., Stepien, O., David-Duflho, M., Brunet, A., Bedioui, F., Marche, P., Devynck, J. Devynck, M.A. Superoxide release from interleukin-1B-stimulated human vascular cells: in situ electrochemical measurement. *Free Radic.Biol.Med.* 27: 554-559, 1999.
385. Publicover, N.G., Hammond, E.M. Sanders, K.M. Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 2087-2091, 1993.
386. Pueyo, M.E., Arnal, J.F., Rami, J. Michel, J.B. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 274: C214-20, 1998.
387. Pulletz.S., Lehmann, C., Volk, T., Schmutzler, M., Ziemer, S., Kox, W. J. Scherer, R. Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia. *Crit.Care Med.* 28: 2881-2886, 2000.
388. Putney, J.W. "Kissin' cousins": intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry. *Cell* 99: 5-8, 1999.
389. Qian, S.Y. Buettner, G.R. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic.Biol.Med.* 26: 1447-1456, 1999.
390. Quartin, A.A., Schein, R.M., Kett, D.H. Peduzzi, P.N. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA* 277: 1058-1063, 1997.
391. Rahman, A., Bando, M., Kefer, J., Anwar, K.N. Malik, A.B. Protein kinase C-activated oxidant generation in endothelial cells signals intercellular adhesion molecule-1 gene transcription. *Mol.Pharmacol.* 55: 575-583, 1999.
392. Rahman, A., Kefer, J., Bando, M., Niles, W.D. Malik, A.B. E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation. *Am.J.Physiol.* 275: L533-L544, 1998.
393. Rajotte, D., Arap, W., Hagedorn, M., Koivunen, E., Pasqualini, R. Ruoslahti, E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J.Clin.Invest.* 102: 430-437, 1998.
394. Rao, G.N. Berk, B.C. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ.Res.* 70: 593-599, 1992.
395. Rauen, U., Hanssen, M., Lauchart, W., Becker, H.D. de-Groot, H. Energy-dependent injury to cultured sinusoidal endothelial cells of the rat liver in UW solution. *Transplantation* 55: 469-473, 1993.
396. Reidy, M.A. Schwartz, S.M. Endothelial injury and regeneration. IV. Endotoxin: a nondenuing injury to aortic endothelium. *Lab.Invest* 48: 25-34, 1983.
397. Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bonthron, D.T., Dewey-CF, J. Gimbrone-MA, J. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 4591-4595, 1993.
398. Richter, N., Petersson, A.S., Wennmalm, A. Schimke, I. Detection of a ~100 kD protein with strong immunoreactivity to antibodies specific for inducible nitric oxide synthase (iNOS) but without NOS activity in neutrophils of patients suffering from sepsis: Results of a preliminary study. *Inflamm.Res.* 48: 651-656, 1999.
399. Risau, W. Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 9: 926-933, 1995.
400. Roebuck, K.A., Carpenter, L.R., Lakshminarayanan, V., Page, S.M., Moy, J.N. Thomas, L.L. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J.Leukoc.Biol.* 65: 291-298, 1999.
401. Ronson, R.S., Nakamura, M. Vinten, J.J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc.Res* 44: 47-59, 1999.
402. Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are

- associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62, 1993.
403. Rosen, G.M. Freeman, B.A. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81: 7269-7273, 1984.
  404. Rosenkranz Weiss, P., Sessa, W.C., Milstien, S., Kaufman, S., Watson, C.A. Pober, J.S. Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J.Clin.Invest.* 93: 2236-2243, 1994.
  405. Rossig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Mulsch, A. Dimmeler, S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J.Biol.Chem.* 274: 6823-6826, 1999.
  406. Roux, F., Durieu, T.O., Chaverot, N., Claire, M., Mailly, P., Bourre, J.M., Strosberg, A.D. Couraud, P.O. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J.Cell Physiol.* 159: 101-113, 1994.
  407. Royall, J.A., Gwin, P.D., Parks, D.A. Freeman, B.A. Responses of vascular endothelial oxidant metabolism to lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha. *Arch.Biochem.Biophys.* 294: 686-694, 1992.
  408. Royall, J.A. Ischiropoulos, H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 302: 348-355, 1993.
  409. Rubin, D.B., Wiener Kronish, J.P., Murray, J.F., Green, D.R., Turner, J., Luce, J.M., Montgomery, A.B., Marks, J.D. Matthay, M.A. Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome. *J.Clin.Invest.* 86: 474-480, 1990.
  410. Rudeck, M., Volk, T., Sitte, N. Grune, T. Ferritin oxidation in vitro: implication of iron release and degradation by the 20S proteasome. *IUBMB Life* 49: 451-456, 2000.
  411. Rudic, R.D., Shesely, E.G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S.S. Sessa, W.C. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J.Clin.Invest.* 101: 731-736, 1998.
  412. Ruiz-Gines, J.A., Lopez-Ongil, S., Gonzalez-Rubio, M., Gonzalez-Santiago, L., Rodriguez-Puyol, M. Rodriguez-Puyol, D. Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 35: 109-113, 2000.
  413. Ryan, U.S., Clements, E., Habliston, D. Ryan, J.W. Isolation and culture of pulmonary artery endothelial cells. *Tissue Cell* 10: 535-554, 1978.
  414. Sattler, M., Winkler, T., Verma, S., Byrne, C.H., Shrikhande, G., Salgia, R. Griffin, J.D. Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood* 93: 2928-2935, 1999.
  415. Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T. Masaki, T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386: 73-77, 1997.
  416. Schleef, R.R., Bevilacqua, M.P., Sawdey, M., Gimbrone-MA, J. Loskutoff, D.J. Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. *J.Biol.Chem.* 263: 5797-5803, 1988.
  417. Schmidt, A.M., Hori, O., Chen, J.X., Li, J.F., Crandall, J., Zhang, J., Cao, R., Yan, S.D., Brett, J. Stern, D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J.Clin.Invest.* 96: 1395-1403, 1995.
  418. Schmidt, H., Schmidt, W., Muller, T., Bohrer, H., Bach, A., Gebhard, M.M. Martin, E. Effect of the 21-aminosteroid tirilazad mesylate on leukocyte adhesion and macromolecular leakage during endotoxemia. *Surgery* 121: 328-334, 1997.
  419. Schmidt, H., Schmidt, W., Muller, T., Bohrer, H., Gebhard, M.M. Martin, E. N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Crit.Care Med.* 25: 858-863, 1997.
  420. Schmidt, H.H., Hofmann, H., Schindler, U., Shutenko, Z.S., Cunningham, D.D. Feelisch, M. No .NO from NO synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 14492-14497, 1996.
  421. Schuppe-Koistinen, I., Gerdes, R., Moldeus, P. Cotgreave, I.A. Studies on the reversibility of protein S-thiolation in human endothelial cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 315: 226-234, 1994.
  422. Sgonc, R., Fuerhapter, C., Boeck, G., Swerlick, R., Fritsch, P. Sepp, N. Induction of apoptosis in human dermal microvascular endothelial cells and infantile hemangiomas by interferon-alpha. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 117: 209-214, 1998.
  423. Shatos, M.A., Doherty, J.M., Orfeo, T., Hoak, J.C., Collen, D. Stump, D.C. Modulation of

- the fibrinolytic response of cultured human vascular endothelium by extracellularly generated oxygen radicals. *J.Biol.Chem.* 267: 597-601, 1992.
424. Shen, B.Q., Lee, D.Y. Zionchek, T.F. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 274: 33057-33063, 1999.
  425. Shen, W., Hintze, T.H. Wolin, M.S. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation* 92 : 3505-3512, 1995.
  426. Shen, Y.H., Wang, X.L. Wilcken, D.E. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett.* 433: 125-131, 1998.
  427. Shibuki, K. An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. *Neurosci.Res.N.Y.* 9: 69-76, 1990.
  428. Shimizu, S., Ishii, M., Kawakami, Y., Momose, K. Yamamoto, T. Protective effects of tetrahydrobiopterin against nitric oxide-induced endothelial cell death. *Life Sci.* 63: 1585-1592, 1998.
  429. Shizukuda, Y., Tang, S., Yokota, R. Ware, J.A. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ.Res.* 85: 247-256, 1999.
  430. Shoemaker, W.C., Appel, P.L. Kram, H.B. Tissue oxygen debt as a determinant of lethal and nonlethal postoperative organ failure. *Crit.Care Med.* 16: 1117-1120, 1988.
  431. Shono, T., Ono, M., Izumi, H., Jimi, S.I., Matsushima, K., Okamoto, T., Kohno, K. Kuwano, M. Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol.Cell Biol.* 16: 4231-4239, 1996.
  432. Sibbald, W., Messmer, K. Fink, M.P. Roundtable Conference on Tissue Oxygenation in Acute Medicine, Brussels, Belgium, 14-16 March 1998. *Intensive Care Med.* 26: 780-791, 2000.
  433. Siegfried, M.R., Ma, X.L. Lefer, A.M. Splanchnic vascular endothelial dysfunction in rat endotoxemia: role of superoxide radicals. *Eur.J.Pharmacol.* 212: 171-176, 1992.
  434. Slowik, M.R., De-Luca, L.G., Min, W. Pober, J.S. Ceramide is not a signal for tumor necrosis factor-induced gene expression but does cause programmed cell death in human vascular endothelial cells. *Circ.Res* 79: 736-747, 1996.
  435. Smith, R.J., Sam, L.M., Justen, J.M., Bundy, G.L., Bala, G.A. Bleasdale, J.E. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 253: 688-697, 1990.
  436. Smith, R.M. Curnutte, J.T. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 77: 673-686, 1991.
  437. Soares, M.P., Muniappan, A., Kaczmarek, E., Koziak, K., Wrighton, C.J., Steinhauslin, F., Ferran, C., Winkler, H., Bach, F.H. Anrather, J. Adenovirus-mediated expression of a dominant negative mutant of p65/RelA inhibits proinflammatory gene expression in endothelial cells without sensitizing to apoptosis. *J.Immunol.* 161: 4572-4582, 1998.
  438. Solomon, M.A., Correa, R., Alexander, H.R., Koev, L.A., Cobb, J.P., Kim, D.K., Roberts, W.C., Quezado, Z.M., Scholz, T.D., Cunnion, R.E. Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis. *Am.J.Physiol.* 266: H757-H768, 1994.
  439. Spack, L., Havens, P.L. Griffith, O.W. Measurements of total plasma nitrite and nitrate in pediatric patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Crit.Care Med.* 25: 1071-1078, 1997.
  440. Spiecker, M., Darius, H., Kaboth, K., Hubner, F. Liao, J.K. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J.Leukoc.Biol.* 63: 732-739, 1998.
  441. Spiecker, M., Peng, H.B. Liao, J.K. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of IkappaBalpha. *J.Biol.Chem.* 272: 30969-30974, 1997.
  442. Spragg, R.G., Hinshaw, D.B., Hyslop, P.A., Schraufstatter, I.U. Cochrane, C.G. Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D1 cells after oxidant injury. *J.Clin.Invest.* 76: 1471-1476, 1985.
  443. Spyridopoulos, I., Sullivan, A.B., Kearney, M., Isner, J.M. Losordo, D.W. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation* 95: 1505-1514, 1997.
  444. Squadrito, G.L. Pryor, W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic.Biol.Med.* 25: 392-403, 1998.
  445. Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N., Pfeilschifter, J. Frank, S. The function of nitric oxide

- in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J.Invest.Dermatol.* 113: 1090-1098, 1999.
446. Stamler, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-936, 1994.
  447. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J., Loscalzo, J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 444-448, 1992.
  448. Stefanec, T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 117: 841-854, 2000.
  449. Stehlik, C., de-Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R. Lipp, J. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J.Exp.Med* 188: 211-216, 1998.
  450. Steinbrecher, U.P. Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 959: 20-30, 1988.
  451. Stoyanovsky, D., Murphy, T., Anno, P.R., Kim, Y.M. Salama, G. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 21: 19-29, 1997.
  452. Suenobu, N., Shichiri, M., Iwashina, M., Marumo, F. Hirata, Y. Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19: 140-146, 1999.
  453. Suhara, T., Fukuo, K., Sugimoto, T., Morimoto, S., Nakahashi, T., Hata, S., Shimizu, M. Ogihara, T. Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells. *J.Immunol.* 160: 4042-4047, 1998.
  454. Summers, B.A., Overholt, J.L. Prabhakar, N.R. Nitric oxide inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism. *J.Neurophysiol.* 81: 1449-1457, 1999.
  455. Suschek, C.V., Krischel, V., Bruch, G.D., Berendji, D., Krutmann, J., Kroncke, K.D. Kolb, B., V. Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J.Biol.Chem.* 274: 6130-6137, 1999.
  456. Sutton, E.T., Norman, J., Rao, P.S., Graham, L.B., Newton, C.A. Richards, I.S. Pulmonary endothelial and epithelial integrity and neutrophil infiltration after endotoxin in interleukin-1 receptor knockout mice. *Shock* 13: 117-125, 2000.
  457. Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W. Bhakdi, S. Effects of Escherichia coli hemolysin on endothelial cell function. *Infect.Immun.* 58: 3796-3801, 1990.
  458. Suttorp, N., Fuhrmann, M., Tannert, O.S., Grimminger, F. Bhadki, S. Pore-forming bacterial toxins potentially induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *J.Exp.Med.* 178: 337-341, 1993.
  459. Suttorp, N., Hessz, T., Seeger, W., Wilke, A., Koob, R., Lutz, F. Drenckhahn, D. Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin in vitro. *Am.J.Physiol.* 255: C368-C376, 1988.
  460. Suttorp, N., Hippenstiel, S., Fuhrmann, M., Krull, M. Podzuweit, T. Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am.J.Physiol.* 270: C778-85, 1996.
  461. Suttorp, N., Toepfer, W. Roka, L. Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase. *Am.J.Physiol.* 251: C671-C680, 1986.
  462. Suttorp, N., Weber, U., Welsch, T. Schudt, C. Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J.Clin.Invest.* 91: 1421-1428, 1993.
  463. Szabo, C., Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., O'Connor, M. Salzman, A.L. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J.Clin.Invest.* 100: 723-735, 1997.
  464. Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K. Goto, T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 26: 265-274, 1990.
  465. Takakuwa, T., Endo, S., Inada, K., Kasai, T., Yamada, Y. Ogawa, M. Assessment of inflammatory cytokines, nitrate/nitrite, type II phospholipase A2, and soluble adhesion molecules in systemic inflammatory response syndrome. *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* 98: 43-52, 1997.
  466. Taylor, F.B., Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Ferrell, G., Chang, A.C., Laszik, Z., Kosanke, S., Peer, G. Esmon, C.T. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against Escherichia coli sepsis. *Blood* 95: 1680-1686, 2000.
  467. Tesfamariam, B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic.Biol.Med* 16: 383-391, 1994.
  468. Thannickal, V.J., Hassoun, P.M., White, A.C. Fanburg, B.L. Enhanced rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from bovine pulmonary artery endothelial cells induced by TGF-beta 1. *Am.J.Physiol.* 265:

- L622-L626, 1993.
469. Toborek, M., Barger, S.W., Mattson, M.P., Barve, S., McClain, C.J. Hennig, B. Linoleic acid and TNF- $\alpha$  cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells. *J.Lipid Res.* 37: 123-135, 1996.
  470. Toborek, M., Blanc, E.M., Kaiser, S., Mattson, M.P. Hennig, B. Linoleic acid potentiates TNF-mediated oxidative stress, disruption of calcium homeostasis, and apoptosis of cultured vascular endothelial cells. *J.Lipid Res.* 38: 2155-2167, 1997.
  471. Topper, J.N., Cai, J., Qiu, Y., Anderson, K.R., Xu, Y.Y., Deeds, J.D., Feeley, R., Gimeno, C.J., Woolf, E.A., Tayber, O., Mays, G.G., Sampson, B.A., Schoen, F.J., Gimbrone-MA, J. Falb, D. Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94: 9314-9319, 1997.
  472. Trepakova, E.S., Cohen, R.A. Bolotina, V.M. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-dependent refilling of  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Circ.Res.* 5: 201-209, 1999.
  473. Tsai, A.G., Friesenecker, B., Mazzoni, M.C., Kerger, H., Buerk, D.G., Johnson, P.C. Intaglietta, M. Microvascular and tissue oxygen gradients in the rat mesentery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95: 6590-6595, 1998.
  474. Tsao, P.S., Buitrago, R., Chan, J.R. Cooke, J.P. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 94: 1682-1689, 1996.
  475. Tsuji, Y., Unno, N., Menconi, M.J., Smith, M. Fink, M.P. Nitric oxide donors increase cytosolic ionized calcium in cultured human intestinal epithelial cells. *Shock* 6: 19-24, 1996.
  476. Tsukahara, H., Gordienko, D.V. Goligorsky, M.S. Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 193: 722-729, 1993.
  477. Tsukahara, H., Gordienko, D.V., Tonshoff, B., Gelato, M.C. Goligorsky, M.S. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int.* 45: 598-604, 1994.
  478. Tsukahara, Y., Morisaki, T., Horita, Y., Torisu, M. Tanaka, M. Expression of inducible nitric oxide synthase in circulating neutrophils of the systemic inflammatory response syndrome and septic patients. *World J.Surg.* 22: 771-777, 1998.
  479. Tsukamoto, A., Kaneko, Y., Yoshida, T., Han, K., Ichinose, M. Kimura, S. 2-Methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen, enhances apoptosis and beta-galactosidase expression in vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 248: 9-12, 1998.
  480. Turner, G.D., Ly, V.C., Nguyen, T.H., Tran, T.H., Nguyen, H.P., Bethell, D., Wyllie, S., Louwrier, K., Fox, S.B., Gatter, K.C., Day, N.P., White, N.J. Berendt, A.R. Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. Correlating dermal microvascular endothelial cell phenotype and soluble cell adhesion molecules with disease severity. *Am.J.Pathol.* 152: 1477-1487, 1998.
  481. Tzeng, E., Kim, Y.M., Pitt, B.R., Lizonova, A., Kovesdi, I. Billiar, T.R. Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. *Surgery* 122: 255-263, 1997.
  482. Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J.P., Nishida, K., Murphy, T.J., Alexander, R.W., Nerem, R.M. Harrison, D.G. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am.J.Physiol.* 269: C1371-C1378, 1995.
  483. Umansky, V., Hehner, S.P., Dumont, A., Hofmann, T.G., Schirmacher, V., Droge, W. Schmitz, M.L. Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- $\kappa$ B implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur.J.Immunol.* 28: 2276-2282, 1998.
  484. Valen, G., Sonden, A., Vaage, J., Malm, E. Kjellstrom, B.T. Hydrogen peroxide induces endothelial cell atypia and cytoskeleton depolymerization. *Free Radic.Biol.Med* 26: 1480-1488, 1999.
  485. Vallet, B. and Leclerc, J. Endothelial cell dysfunction in septic shock. In: *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. J.L. Vincent, ed. Springer, Berlin, pp. 133-142, 1998.
  486. van Dissel, J.T., vanLangevelde, P., Westendorp, R.G.J., Kwappenberg, K. Frolich, M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 351: 950-953, 1998.
  487. van Gorp, R.M., Broers, J.L., Reutelingsperger, C.P.M., Bronnenberg, N.M.H.J., Hornstra, G., Van Dam-Mieras, M.C.E. Heemskerk, J.W.M. Peroxide-induced membrane blebbing in endothelial cells associated with glutathione oxidation but not apoptosis. *Am.J.Physiol.* 277: C20-C28, 1999.
  488. Varani, J., Dame, M.K., Gibbs, D.F., Taylor, C.G., Weinberg, J.M., Shayevitz, J. Ward, P.A. Human umbilical vein endothelial cell killing by activated neutrophils. Loss of sensitivity to

- injury is accompanied by decreased iron content during in vitro culture and is restored with exogenous iron. *Lab.Invest.* 66: 708-714, 1992.
489. Villarete, L.H. Remick, D.G. Nitric oxide regulation of IL-8 expression in human endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 211: 671-676, 1995.
  490. Vincent, J.L., Bihari, D.J., Suter, P.M., Bruining, H.A., White, J., Nicolas, C.M., Wolff, M., Spencer, R.C. Hemmer, M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 274: 639-644, 1995.
  491. Viner, R.I., Williams, T.D. Schöneich, C. Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry* 38: 12408-12415, 1999.
  492. Vischer, U.M., Jornot, L., Wollheim, C.B. Theler, J.M. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. *Blood* 85: 3164-3172, 1995.
  493. Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A. Brasier, A.R. Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 94: 1878-1889, 1999.
  494. Volk, T., Gerst, J., Faust, B.G., Stroehmann, A. Kox, W.J. Monocyte stimulation by reactive oxygen species: role of superoxide and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Inflamm. Res.* 48: 544-549, 1999.
  495. Volk, T., Hensel, M. Kox, W.J. Transient Ca<sup>2+</sup> changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide. *Mol.Cell Biochem.* 171: 11-21, 1997.
  496. Volk, T., Hensel, M., Mading, K., Egerer, K. Kox, W.J. Intracellular Ca<sup>2+</sup> dependence of nitric oxide mediated enhancement of interleukin-8 secretion in human endothelial cells. *FEBS Lett.* 415: 169-172, 1997.
  497. Volk, T., Hensel, M., Schuster, H. Kox, W.J. Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells. *Mol.Cell Biochem.* 206: 105-112, 2000.
  498. Volk, T., Ioannidis, I., Hensel, M., deGroot, H. Kox, W.J. Endothelial damage induced by nitric oxide: synergism with reactive oxygen species. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 213: 196-203, 1995.
  499. Volk, T. Kox, W.J. Endothelium function in sepsis. *Inflamm.Res.* 49: 185-198, 2000.
  500. Volk, T., Mading, K., Hensel, M. Kox, W.J. Nitric oxide induces transient Ca<sup>2+</sup> changes in endothelial cells independent of cGMP. *J.Cell Physiol.* 172: 296-305, 1997.
  501. Wagner, J.G. Roth, R.A. Neutrophil migration during endotoxemia. *J.Leukoc.Biol.* 66: 10-24, 1999.
  502. Walisser, J.A. Thies, R.L. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in oxidant-stressed endothelial cells prevents oncosis and permits caspase activation and apoptosis. *Exp.Cell Res.* 251: 401-413, 1999.
  503. Walker, D.H., Popov, V.L., Crocquet, V.P., Welsh, C.J. Feng, H.M. Cytokine-induced, nitric oxide-dependent, intracellular antirickettsial activity of mouse endothelial cells. *Lab.Invest.* 76: 129-138, 1997.
  504. Wang, J.H., Redmond, H.P., Watson, R.W., Condrón, C. Bouchier, H.D. Involvement of tyrosine protein kinase in IFN-gamma-induced human endothelial cell apoptosis. *Shock* 11: 311-318, 1999.
  505. Wang, P., Ba, Z.F. Chaudry, I.H. Nitric oxide. To block or enhance its production during sepsis? *Arch.Surg.* 129: 1137-1142, 1994.
  506. Wang, P., Ba, Z.F. Chaudry, I.H. Endothelium-dependent relaxation is depressed at the macro- and microcirculatory levels during sepsis. *Am.J.Physiol.* 269: R988-R994, 1995.
  507. Wang, P., Wood, T.J., Ba, Z.F. Chaudry, I.H. Pentoxifylline maintains vascular endothelial cell function during hyperdynamic and hypodynamic sepsis. *Surgery* 120: 367-373, 1996.
  508. Wang, S.Y., Cameron, E.M., Fink, M.P. Sellke, F.W. Chronic septicemia alters alpha-adrenergic mechanisms in the coronary circulation. *J.Surg.Res.* 69: 61-66, 1997.
  509. Wang, W. Diamond, S.L. Does elevated nitric oxide production enhance the release of prostacyclin from shear stressed aortic endothelial cells? *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 233: 748-751, 1997.
  510. Wang, X., Lau, F., Li, L., Yoshikawa, A. Van-Breemen, C. Acetylcholine-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> store in fresh endothelial cells and evidence for ryanodine receptors. *Circ.Res.* 77: 37-42, 1995.
  511. Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Strobel, M., Ziegler Heitbrock, H.W. Weber, P.C. Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization



- and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler.Thromb.* 14: 1665-1673, 1994.
512. Weiss, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J.Med.* 320: 365-376, 1989.
  513. Wesson, D.E. Elliott, S.J. Xanthine oxidase inhibits transmembrane signal transduction in vascular endothelial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 270: 1197-1207, 1994.
  514. Wheeler, A.P. Bernard, G.R. Treating patients with severe sepsis. *N.Engl.J.Med.* 340: 207-214, 1999.
  515. Whitehurst, R.M., Laskey, R., Goldberg, R.N., Herbert, D. Van-Breemen, C. Influence of group B streptococci on piglet pulmonary artery response to bradykinin. *J.Appl.Physiol.* 86: 61-65, 1999.
  516. Willmott, N.J., Galione, A. Smith, P.A. Nitric oxide induces intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and increases secretion of incorporated 5-hydroxytryptamine in rat pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.* 371: 99-104, 1995.
  517. Wink, D.A., Feelisch, M., Fukuto, J., Chistodoulou, D., Jourdain, D., Grisham, M.B., Vodovotz, Y., Cook, J.A., Krishna, M., DeGraff, W.G., Kim, S., Gamson, J. Mitchell, J.B. The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch.Biochem.Biophys.* 351: 66-74, 1998.
  518. Wink, D.A. Mitchell, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic.Biol.Med.* 25: 434-456, 1998.
  519. Wiseman, H. Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem.J.* 313: 17-29, 1996.
  520. Wolin, M.S., Burke, W.T. Mohazzab, H.K. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir.Physiol* 115: 229-238, 1999.
  521. Wong, H.R., Carcillo, J.A., Burckart, G., Shah, N. Janosky, J.E. Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome. *Crit.Care Med.* 23: 835-842, 1995.
  522. Woodman, C.R., Muller, J.M., Rush, J.W., Laughlin, M.H. Price, E.M. Flow regulation of eNOS and Cu/Zn SOD mRNA expression in porcine coronary arterioles. *Am.J.Physiol.* 276: H1058-H1063, 1999.
  523. Wung, B.S., Cheng, J.J., Hsieh, H.J., Shyy, Y.J. Wang, D.L. Cyclic strain-induced monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator protein 1. *Circ.Res.* 81: 1-7, 1997.
  524. Wylam, M.E., Samsel, R.W., Umans, J.G., Mitchell, R.W., Leff, A.R. Schumacker, P.T. Endotoxin in vivo impairs endothelium-dependent relaxation of canine arteries in vitro. *Am.Rev.Respir.Dis.* 142: 1263-1267, 1990.
  525. Xia, P., Wang, L., Gamble, J.R. Vadas, M.A. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 274: 34499-34505, 1999.
  526. Xia, Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Snyder, S.H. Zweier, J.L. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 6770-6774, 1996.
  527. Xia, Y. Zweier, J.L. Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94: 12705-12710, 1997.
  528. Xu, L., Eu, J.P., Meissner, G. Stamler, J.S. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279: 234-237, 1998.
  529. Xu, X.P., Pollock, J.S., Tanner, M.A. Myers, P.R. Hypoxia activates nitric oxide synthase and stimulates nitric oxide production in porcine coronary resistance arteriolar endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* 30: 841-847, 1995.
  530. Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y. Koizumi, S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J.Clin.Invest.* 103: 129-135, 1999.
  531. Yamada, Y., Teraoka, H., Nakazato, Y. Ohga, A. Intracellular Ca<sup>2+</sup> antagonist TMB-8 blocks catecholamine secretion evoked by caffeine and acetylcholine from perfused cat adrenal glands in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Neurosci.Lett.* 90: 338-342, 1988.
  532. Yan, L., Vandivier, R.W., Suffredini, A.F. Danner, R.L. Human polymorphonuclear leukocytes lack detectable nitric oxide synthase activity. *J.Immunol.* 153: 1825-1834, 1994.
  533. Yasuda, M., Shimizu, S., Naito, S., Yamamoto, T. Kuroiwa, Y. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci.* 64: 249-258, 1999.
  534. Yeh, L.-H., Park, Y.J., Hansalia, R.J., Ahmed, I.S., Deshpande, S.S., Goldschmidt-Clermont, P.J., Irani, K. Alevriadou, B.R. Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells

- requires Rac1-dependent production of ROS. *Am.J.Physiol.* 276: C838-C847, 1999.
535. Ying, X., Minamiya, Y., Fu, C. Bhattacharya, J.  $Ca^{2+}$  waves in lung capillary endothelium. *Circ.Res.* 79: 898-908, 1996.
  536. Yoshizumi, M., Perrella, M.A., Burnett-JC, J. Lee, M.E. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ.Res.* 73: 205-209, 1993.
  537. Young, J.S., Headrick, J.P. Berne, R.M. Endothelial-dependent and -independent responses in the thoracic aorta during endotoxic shock. *Circ.Shock* 35: 25-30, 1991.
  538. Zahler, S., Kupatt, C. Becker, B.F. Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-alpha. *FASEB J.* 14: 555-564, 2000.
  539. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B. Kroemer, G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J.Exp.Med* 182: 367-377, 1995.
  540. Zeiher, A.M., Fisslthaler, B., Schray, U.B. Busse, R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ.Res.* 76: 980-986, 1995.
  541. Zen, K., Karsan, A., Stempien-Otero, A., Yee, E., TupperJ., Li, X., Eunson, T., Kay, M.A., Winn, R.K. Harlan, J.M. NF-kappaB activation is required for human endothelial survival during exposure to tumor necrosis factor-alpha but not to interleukin-1beta or lipopolysaccharide. *J.Biol.Chem.* 274: 28808-28815, 1999.
  542. Zetter, B.R. The endothelial cells of large and small blood vessels. *Diabetes* 30: 24-28, 1981.
  543. Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Mancinelli, R., Xu, X.P., Jin, Y., Faure, E., Mantovani, A., Rothe, M., Muzio, M. Ardit, M. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J.Biol.Chem.* 274: 7611-7614, 1999.
  544. Zhang, H., Schmeisser, A., Garlichs, C.D., Plotze, K., Damme, U., Mügge, A. Daniel, W.G. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc.Res.* 44: 215-222, 1999.
  545. Zhou, M., Wang, P. Chaudry, I.H. Endothelial nitric oxide synthase is downregulated during hyperdynamic sepsis. *Biochim.Biophys.Acta* 1335: 182-190, 1997.
  546. Ziegelstein, R.C., Cheng, L. Capogrossi, M.C. Flow-dependent cytosolic acidification of vascular endothelial cells. *Science* 258: 656-659, 1992.
  547. Ziegelstein, R.C., Corda, S., Pili, R., Passaniti, A., Lefer, D., Zweier, J.L., Fraticelli, A. Capogrossi, M.C. Initial contact and subsequent adhesion of human neutrophils or monocytes to human aortic endothelial cells releases an endothelial intracellular calcium store. *Circulation* 90: 1899-1907, 1994.